



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**AISLAMIENTO Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS T REGULADORAS  
ALOSPECÍFICAS CON POTENCIAL TERAPÉUTICO EN PACIENTES CON  
TRASPLANTE RENAL**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS**

**Presenta:**

**ARIMELEK CORTÉS HERNÁNDEZ**

**Tutor principal:**

**DRA. MARÍA GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM**

**Miembros del comité tutor:**

**DRA. KARINA CHÁVEZ RUEDA  
Centro Médico Nacional Siglo XXI**

**DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM**

**Ciudad Universitaria, CD. MX., Noviembre, 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



**SINODALES DESIGNADOS**  
**Presente**

Estimado académico:

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 15 de junio del presente año, conocieron la solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del/la estudiante **Cortés Hernández Arimelek**, con la tesis **"Aislamiento y expansión de células T reguladoras aloespecíficas con potencial terapéutico en pacientes con trasplante renal"**, dirigida por el/la Dr(a). **Soldevila Melgarejo María Gloria**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado en el que se encuentra usted incluido:

		Acepto			
PRESIDENTE	Zenteno Galindo Edgar	Si <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	30/06/2020 fecha	
VOCAL	Bobadilla Sandival Norma	Si <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	1/07/20 fecha	
VOCAL	Lascurain Ledesma Ricardo	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	31/07/20 fecha	
VOCAL	Rosales Ledezma Carlos	Si <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	6/07/2020 fecha	
SECRETARIO	Bonifaz Alfonso Laura	Si <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	30/06/2020 fecha	

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 15 de junio de 2020

**Dra. Ana Brígida Clornda Arias Álvarez**  
Coordinadora

El presente trabajo de investigación fue apoyado por el proyecto CONACYT-Salud #272518. ACH fue apoyado con beca de CONACYT con CVU #549444. La asistencia al XXI Congreso Nacional de la Sociedad Nacional de trasplante y al V Congreso Europeo de Inmunología fueron apoyados 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, UNAM. Se agradece al Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo (LABNALCIT) por su apoyo técnico en la realización del presente proyecto de investigación.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
ÍNDICE DE TABLAS .....	4
RESUMEN.....	5
1. INTRODUCCIÓN .....	6
1.1. Importancia del trasplante renal .....	6
1.2. Inmunobiología del trasplante.....	7
1.2.1. Respuesta inmune innata en el trasplante.....	10
1.2.2. Respuesta inmune adaptativa en el trasplante .....	12
1.3. Fármacos inmunosupresores y sus efectos adversos.....	17
1.4. Células T reguladoras.....	20
1.4.1. Ontogenia de las células Tregs.....	20
1.4.2. Regulación transcripcional y epigenética de la expresión del FOXP3.....	24
1.4.3. Mecanismos de supresión de las células Tregs .....	27
1.5. Células Tregs en la inducción de tolerancia al trasplante .....	32
1.6. Inmunoterapia con células Tregs en trasplante y sus retos .....	34
1.6.1 Aislamiento y expansión <i>ex vivo</i> .....	34
1.6.2. Especificidad.....	35
1.6.3. Dosis.....	37
1.6.4. Estabilidad.....	37
1.6.5. Efecto de los fármacos inmunosupresores sobre las células Tregs .....	38
1.7. Primeros ensayos clínicos con células Tregs en humanos .....	40
2. JUSTIFICACIÓN .....	44
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	45
4. OBJETIVO GENERAL .....	45
5. OBJETIVOS PARTICULARES.....	45
6. METODOLOGÍA .....	46
6.1. Sujetos.....	46
6.2. Materiales y reactivos .....	47
6.3. Separación y criopreservación de células mononucleares .....	48
6.4. Purificación de células Tregs .....	48

6.5. Expansión policlonal de células Tregs.....	49
6.6. Ensayo de supresión policlonal <i>in vitro</i> .....	49
6.7. Células dendríticas derivadas de monocitos (CDs-Mo).....	50
6.8. Aislamiento y expansión <i>ex vivo</i> de Tregs aloespecíficas .....	50
6.9. Ensayo de supresión aloantígeno específico <i>in vitro</i> .....	51
6.10. Análisis del fenotipo por citometría de flujo.....	51
6.11. Análisis de la metilación de la TSDR en el gen de Foxp3 .....	52
6.12. Análisis Estadístico .....	52
6.13. Diagrama de Flujo.....	53
7. RESULTADOS.....	54
7.1. Expansión <i>ex vivo</i> de células Tregs policlonales de receptores renales tratados con BLT ....	54
7.1.1. La expansión de células Tregs de los pacientes Tx-BLT aumenta la expresión del FOXP3 y su función supresora .....	54
7.1.2. Las células Tregs expandidas mantienen su función supresora ante un microambiente inflamatorio.....	58
7.1.3. La expansión <i>ex vivo</i> de las células Tregs no restaura el estado de desmetilación de la TSDR en las Tregs de los pacientes Tx-BLT.....	60
7.2. Expansión <i>ex vivo</i> de células Tregs aloespecíficas de pacientes con ERC .....	61
7.2.1. Las células Tregs de los pacientes con ERC mantienen su expresión de FOXP3 después de ser expandidas a largo plazo.....	61
7.2.2. Las Tregs aloespecíficas expandidas suprimen la proliferación células Tconv de manera antígeno-específica.....	64
7.2.3. Las Tregs aloespecíficas mantienen su fenotipo supresor después de ser estimuladas en un microambiente inflamatorio y ser criopreservadas .....	66
8. DISCUSIÓN .....	70
9. CONCLUSIONES .....	78
10. PERSPECTIVAS FUTURAS .....	79
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	81
ANEXO I: REACTIVOS .....	94
ANEXO II: ESTRATEGIAS DE ANÁLISIS PARA CITOMETRÍA DE FLUJO .....	95
ANEXO III: PUBLICACIÓN.....	97

## ABREVIATURAS

<b>A<sub>2A</sub>R</b>	<i>Adenosine 2A receptor</i> (Receptor de adenosina 2A)
<b>Acs-ADE</b>	Anticuerpos anti-donador específicos
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>AKT</b>	Proteína cinasa B
<b>al<sup>o</sup>Tregs</b>	Células Tregs aloantígeno-específicas
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ATP</b>	Adenosín Trifosfato
<b>ATRA</b>	<i>All-trans retinoic acid</i> (Ácido holo-transretinoico)
<b>BLT</b>	Belatacept
<b>CCL-</b>	<i>Chemokine C-C motif ligand-</i> (Ligando de quimiocina con motivos C-C -)
<b>CCR-</b>	<i>C-C chemokine receptor</i> (Receptor de quimiocina tipo C-C)
<b>CD25</b>	Cadena $\alpha$ del receptor para Interleucina 2
<b>CD39</b>	Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa-1
<b>CD73</b>	Ecto-5'-nucleotidasa
<b>CD127</b>	Cadena $\alpha$ del receptor para Interleucina 7
<b>CFSE</b>	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i> (Éster de succinimidil-carboxifluoresceína)
<b>CMN</b>	Células Mononucleares
<b>CNS</b>	<i>Conserved Non-Coding Sequences</i> (Secuencias No codificadas Conservadas)
<b>CPA</b>	Célula Presentadora de Antígeno
<b>CsA</b>	<i>Ciclosporina A</i>
<b>CTLA-4</b>	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i> (Antígeno 4 del linfocito T citotóxico)
<b>CTV</b>	<i>CellTrace™ Violet</i>
<b>CXCR-</b>	<i>C-X-C Motif Chemokine Receptor</i> (Receptor de quimiocinas con motivos C-X-C)
<b>DAMPs</b>	<i>Damage-associated molecular patterns</i> (Patrones moleculares asociados a daño)
<b>CDs</b>	Células Dendríticas
<b>EEM</b>	Error estándar de la media
<b>EICH</b>	Enfermedad Injerto Contra Huésped
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence activated cell sorter</i> (Separación Celular Activada por Fluorescencia)
<b>FMO</b>	<i>Fluorescence Minus One</i> (Fluorescencia menos uno)
<b>FoxO</b>	<i>Forkhead box O</i>
<b>FOXP3</b>	<i>Forkhead box P3</i>
<b>GM-CSF</b>	<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> (Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos)
<b>HLA</b>	<i>Human leukocyte antigen</i> (antígeno leucocitario humano)
<b>IDO</b>	Indoleamina 2,3-dioxigenasa
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón Gamma
<b>IL-</b>	Interleucina
<b>IMF</b>	Intensidad Media o Mediana de Fluorescencia
<b>INCMN-SZ</b>	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
<b>I/R</b>	Isquemia/Reperfusión
<b>ERC</b>	Enfermedad Renal Crónica

<b>iTregs</b>	Células T reguladoras inducidas <i>in vitro</i>
<b>LAG-3</b>	<i>Lymphocyte-activation gene 3</i> (Gen 3 de activación de linfocitos)
<b>MACS</b>	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
<b>MHC</b>	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complejo Principal de Histocompatibilidad)
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>MLR</b>	<i>Mixed lymphocyte reaction</i> (Reacción linfocitaria mixta)
<b>mTOR</b>	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i> (Diana de rapamicina en células de mamífero)
<b>NFAT</b>	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i> (factor nuclear de las células T activadas)
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	<i>Nuclear factor kappa B</i> (factor nuclear kappa B)
<b>ng</b>	Nanogramos
<b>NKs</b>	<i>Natural Killers Cells</i> (Células Asesinas Naturales)
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i> (Amortiguador de Fosfato Salino)
<b>PD-1</b>	<i>Programed death-1</i> (Proteína 1 de Muerte programada)
<b>PI3K</b>	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i> (Fosfatidil inositol 3 cinasa)
<b>PRR</b>	<i>Pattern-recognition receptors</i> (Receptores de reconocimientos de patrones)
<b>pTregs</b>	Células T reguladoras periféricas
<b><sup>poli</sup>Tregs</b>	Células Tregs expandidas policlonalmente <i>ex vivo</i> en presencia de rapamicina
<b>RAR</b>	Receptor de ácido retinoico
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>SH-AB</b>	Suero Humano AB
<b>SMAD3</b>	Mothers against decapentaplegic 3
<b>STAT5</b>	<i>Signal transducer and activator of transcription 5</i> (Transductor de señales y activador transcripcional 5)
<b>Tconv</b>	Células T convencionales
<b>TCR</b>	<i>Receptor T cell</i> (Receptor de Células T)
<b>TCTH</b>	Trasplante de células troncales hematopoyéticas
<b>TET</b>	<i>Tet methylcytosine dioxygenase</i> (metilcitosina dioxigenasa)
<b>TSDR</b>	<i>Treg-specific demethylated región</i> (Región desmetilada específica de Tregs)
<b>Tregs</b>	Células T reguladoras
<b>tTregs</b>	Células T reguladoras tímicas
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming Growth Factor Beta</i> (Factor de crecimiento transformante beta)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i> (Factor de necrosis tumoral alfa)
<b>Th</b>	<i>Helper T cells</i> (Células T Cooperadoras)
<b>TLR</b>	<i>Toll-like receptors</i> (Receptores tipo Toll)
<b>Tx-BLT</b>	Tratados con belatacept
<b>UI</b>	Unidades Internacionales

## ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Título	Página
1	Tipos de rechazo de órganos vascularizados trasplantados.	9
2	Vías de señalización del TCR.	12
3	Vías de reconocimiento del aloantígeno por las células T.	14
4	Participación de las células T CD4 <sup>+</sup> en la respuesta inmunológica al aloinjerto.	16
5	Mecanismos de acción de los agentes inmunosupresores.	18
6	Ontogenia de las células T reguladoras.	21
7	Regulación transcripcional de la expresión del FOXP3.	26
8	Mecanismos de supresión ejercidos por las células T reguladoras.	27
9	Participación de células Tregs en la inducción de tolerancia al trasplante.	32
10	Esquemas de los protocolos de aislamiento y expansión <i>ex vivo</i> de células Tregs.	53
11	Las células Tregs de los receptores renales tratados con belatacept aumentan la expresión del FOXP3 y CD25 después de ser expandidas <i>ex vivo</i>	55
12	Las células Tregs de los receptores renales Tx-BLT expandidas con rapamicina mantienen su expresión de Helios e incrementan su expresión del CTLA-4 y CCR7.	56
13	Las células Tregs de los pacientes Tx-BLT expandidas tienen una gran capacidad supresora <i>in vitro</i> .	57
14	Las células Tregs de los pacientes Tx-BLT expandidas disminuyen la expresión del FOXP3 en presencia de IL-6 y TNF- $\alpha$ .	59
15	La expansión <i>ex vivo</i> en presencia de rapamicina no restablece el estado de desmetilación en las células Tregs de los pacientes tratados con BLT.	60
16	Los pacientes con enfermedad renal crónica tienen una frecuencia normal de células Tregs CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> CD127 <sup>-</sup> en sangre.	62
17	Las células Tregs aloespecíficas de los pacientes con ERC incrementan la expresión de los marcadores FOXP3 y CD25 después de la expansión <i>ex vivo</i> .	63
18	Las células Tregs aloespecíficas de los pacientes con ERC expandidas tienen una alta expresión de las proteínas CTLA-4, LAG-3 y CD39.	64
19	Las células Tregs aloespecíficas de pacientes con ERC expandidas <i>ex vivo</i> suprimen la proliferación de las células Tconv de manera antígeno-específica.	65
20	Las células Tregs aloespecíficas mantienen su fenotipo inmunorregulador después de ser estimuladas en un microambiente inflamatorio.	67
21	La expansión <i>ex vivo</i> a largo plazo disminuye la desmetilación de la TSDR en las células Tregs aloespecíficas de los pacientes con ERC.	68
22	Las células Tregs aloespecíficas de los pacientes con ERC son fenotípicamente estables después de una criopreservación a largo plazo.	69

## ÍNDICE DE TABLAS

Número	Título	Página
<b>1</b>	Participación de los DAMPs y los PRRs en la respuesta inmune al trasplante.	<b>11</b>
<b>2</b>	Efectos adversos de los fármacos inmunosupresores.	<b>19</b>
<b>3</b>	Participación de los mecanismos de supresión de las células Tregs en la respuesta inmune al trasplante.	<b>31</b>
<b>4</b>	Efecto de los inmunosupresores sobre la homeostasis de las células Tregs.	<b>39</b>
<b>5</b>	Terapia adoptiva de células Tregs en humanos para prevenir o tratar la EICH.	<b>41</b>
<b>6</b>	Terapia adoptiva de células Tregs en humanos en pacientes con trasplante de órganos sólidos.	<b>43</b>
<b>7</b>	Datos demográficos de los receptores renales tratados con BLT.	<b>54</b>
<b>8</b>	Características demográficas de los pacientes con enfermedad renal crónica.	<b>61</b>

---

## RESUMEN

**Introducción:** Las células T reguladoras (Tregs) FOXP3<sup>+</sup> son esenciales para la inducción y el mantenimiento de la tolerancia al aloinjerto, por lo tanto, serían una alternativa terapéutica al uso de fármacos inmunosupresores, los cuales tienen efectos adversos en pacientes con trasplante renal a largo plazo. Debido al bajo número de células Tregs en sangre, es necesario expandirlas *ex vivo* para obtener los números necesarios para su aplicación clínica. Además, nuestro grupo recientemente reportó que receptores renales tratados con belatacept (un inhibidor específico de la coestimulación) tienen una disminución de las células Tregs en sangre, las cuales presentaban menor expresión del FOXP3 (factor de transcripción que modula la función inmunorreguladora), menor capacidad supresora *in vitro* y disminución de la desmetilación de citosinas en una región específica (TSDR) del locus de *Foxp3*, una marca epigenética necesaria para mantener la expresión de FOXP3. El objetivo del presente trabajo fue evaluar si es factible expandir las Tregs de pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) candidatos a trasplante y de pacientes con trasplante renal tratados con belatacept (Tx-BLT), para obtener Tregs funcionalmente estables que puedan ser usadas como inmunoterapia.

**Metodología:** Para muestras de pacientes Tx-BLT: células Tregs purificadas de sangre, se expandieron policlonalmente con anti-CD3/-CD28, IL-2 y rapamicina (<sup>poli</sup>Tregs) durante cuatro semanas. Para muestras de pacientes con ERC: células Tregs se estimularon con células dendríticas alogénicas durante siete días; después, se purificaron las Tregs aloantígeno-específicas (<sup>alo</sup>Tregs) y se expandieron policlonalmente cuatro semanas. Al final de la expansión, se realizó: la evaluación de la expresión de proteínas inmunorreguladoras mediante citometría de flujo; ensayos de supresión *in vitro*; ensayos de estabilidad funcional en presencia de citocinas inflamatorias (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6 y TNF- $\alpha$ ) y se determinó la desmetilación de citosinas en la TSDR-*Foxp3*.

**Resultados:** Las <sup>poli</sup>Tregs de los pacientes Tx-BLT: expresaron altos niveles del FOXP3, CD25, CTLA-4 y CCR7; mostraron una fuerte actividad supresora, aún en presencia de citocinas proinflamatorias; sin embargo, las Tregs disminuyeron la expresión de FOXP3 en presencia de IL-6 y TNF- $\alpha$ , lo que se correlacionó con una hipermetilación de la TSDR-*Foxp3*. Las <sup>alo</sup>Tregs de los pacientes con ERC expandidas: tienen altos niveles de marcadores CD25, FOXP3, CTLA-4, LAG-3 y CD39; suprimieron la proliferación de células T de manera antígeno-específica, aún en presencia de citocinas inflamatorias; mantuvieron su fenotipo supresor después de ser activadas en un microambiente inflamatorio y ser criopreservadas; datos preliminares muestran que la estimulación *in vitro* a largo plazo disminuye la desmetilación de la TSDR en las células <sup>alo</sup>Tregs.

**Conclusiones:** 1) La expansión *ex vivo* de células Tregs de los pacientes Tx-BLT aumenta la expresión del FOXP3 y su capacidad supresora *in vitro*, sin embargo, mantiene la hipermetilación de citosinas en la TSDR-*Foxp3*. 2) Las células Tregs aloantígeno-específicas de pacientes con ERC pueden ser expandidas *ex vivo* para obtener células funcionales con un potencial terapéutico para la inducción de tolerancia al trasplante.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Importancia del trasplante renal

Los riñones son órganos que realizan funciones vitales en el cuerpo como el control del balance hidroelectrolítico y el pH corporal, modulando la cantidad de agua y solutos en la sangre. Filtran aproximadamente 200 litros de sangre al día, lo cual permite la eliminación de sustancias de desecho y la reabsorción de nutrientes. También secretan hormonas como la eritropoyetina para estimular la producción de eritrocitos de la sangre, y la renina para regular la presión arterial. Además, metabolizan la vitamina D que es esencial para mantenimiento óseo<sup>[1]</sup>. Por lo anterior, una alteración en la función del riñón afecta significativamente la calidad y esperanza de vida de las personas.

La enfermedad renal (ER) describe una situación clínica en la cual, los riñones han perdido la capacidad de llevar a cabo sus funciones eficazmente y actualmente es uno de los principales problemas de salud en México, debido a sus altas tasas de morbilidad y mortalidad. En el 2018, la ER fue la décima causa de muerte en nuestro país, registrándose 13845 defunciones por esta enfermedad<sup>[2]</sup>. La ER se presenta en dos formas clínicas: aguda y crónica. La enfermedad renal aguda (ERA) es definida como una disminución abrupta de la función renal que puede darse en horas, días o semanas (<90 días)<sup>[3]</sup>. La ERA está asociada con altas tasas de morbilidad y de mortalidad. Se estima que aproximadamente 2 millones de personas en todo el mundo mueren cada año de ERA, mientras que los sobrevivientes tienen un mayor riesgo de desarrollar enfermedad renal crónica<sup>[3]</sup>.

La enfermedad renal crónica (ERC) se define como la presencia de un daño renal que persiste durante tres o más meses, independientemente de la causa<sup>[4]</sup>. La ERC es un proceso fisiopatológico multifactorial, progresivo e irreversible que frecuentemente resulta en la necesidad de terapia de reemplazo renal (diálisis o trasplante)<sup>[4]</sup>. Existen diversas condiciones clínicas asociadas a la ERC, entre las que se encuentran la hipertensión arterial sistémica, la diabetes mellitus, infecciones, glomerulonefritis, fármacos nefrotóxicos, antecedente de ERA, entre otras<sup>[5]</sup>. En México, la etiología más frecuente de ERC es la diabetes *mellitus* (~50%), seguida por la hipertensión arterial (~20%) y las glomerulopatías (~13%)<sup>[6]</sup>. Lo anterior toma relevancia clínica dado que la diabetes *mellitus* y la hipertensión son dos de las principales enfermedades crónicas en el país, afectando a 8.6 millones y 15.2 millones de

mexicanos, respectivamente<sup>[7]</sup>. Además, un estudio reciente realizado en México reportó que del total de registros en los que se consignó a la ERC como causa del fallecimiento, aproximadamente 48% era concomitante con diabetes *mellitus* y 16% con hipertensión<sup>[8]</sup>.

El trasplante renal es actualmente la terapia de elección para la mayoría de las causas de ERC, debido a que mejora la calidad de vida del paciente al prescindir de la dependencia de diálisis y lo más importante, prolonga la vida del paciente. De acuerdo al Centro Nacional de Trasplantes (CENATRA), el riñón es el segundo órgano más trasplantado en los mexicanos habiéndose realizado 2939 trasplantes renales en el 2019<sup>[9]</sup>. Además, es importante mencionar que actualmente existen 17410 pacientes en espera de un trasplante renal, lo cual representa casi tres cuartas partes (74%) de todos los receptores en lista en espera de cualquier órgano sólido (sistema informático del CENATRA, corte al 31 de agosto de 2020).

## **1.2. Inmunobiología del trasplante**

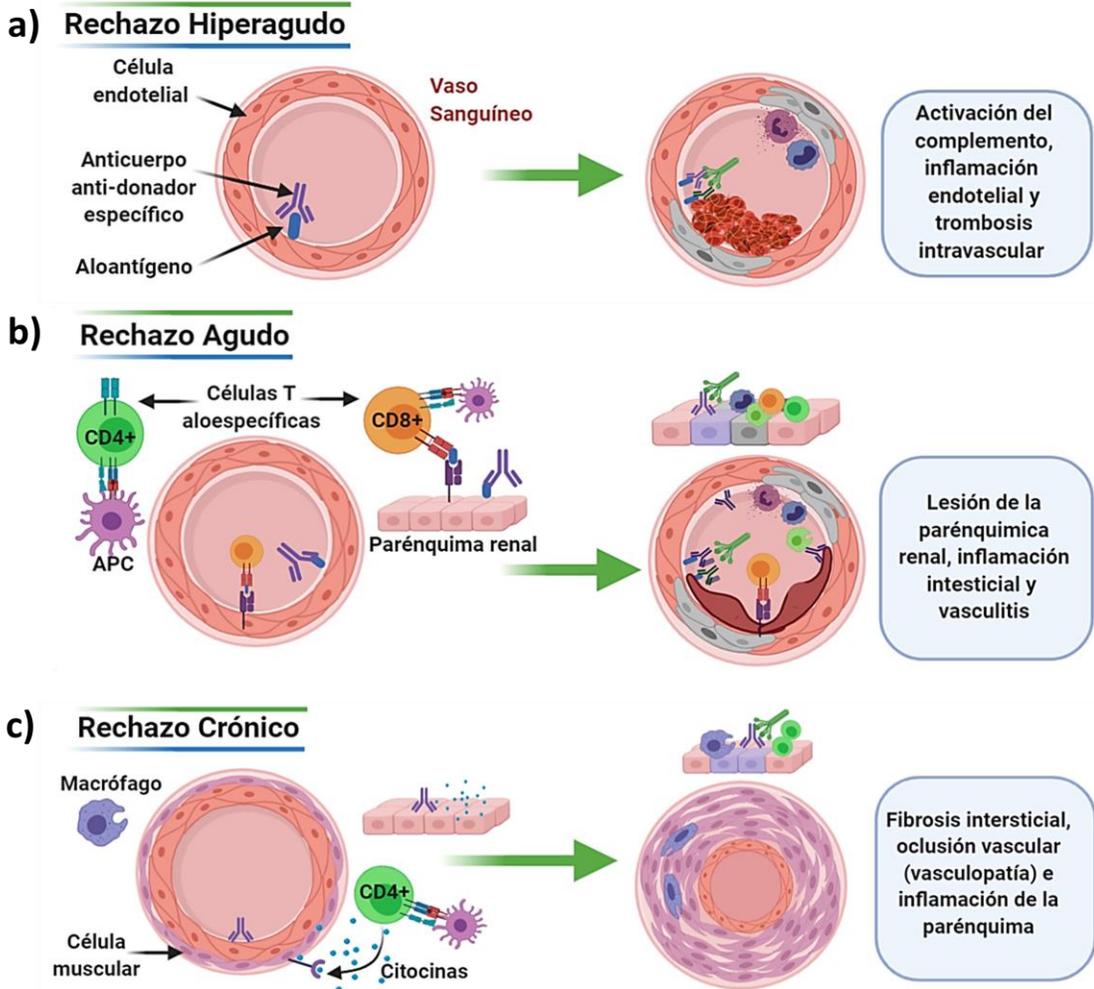
El objetivo principal después del trasplante renal es prevenir el rechazo del injerto y, al mismo tiempo, aumentar la calidad de vida y la sobrevida del paciente. El rechazo al trasplante es una consecuencia de las diferencias genéticas entre el donador y el receptor, lo cual trae consigo que proteínas expresadas específicamente en el órgano trasplantado puedan ser reconocidas como antígenos extraños (aloantígenos) por el sistema inmunológico del receptor, desencadenando una respuesta inflamatoria cuyo objetivo es la eliminación de los elementos extraños<sup>[10]</sup>. Las principales diferencias genéticas entre el donador y el receptor se encuentran codificadas en el sistema del antígeno leucocitario humano (HLA), también conocido como el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) para todos los vertebrados. En el humano, las proteínas del HLA son las más polimórficas, es decir, contienen mínimas diferencias en la secuencia de aminoácidos de un individuo a otro. La función de estas proteínas es participar en la presentación antigénica y existen dos tipos: las de clase-I, expresadas por todas las células nucleadas, y las de clase-II, presentes solo en las células presentadoras de antígenos (CPAs) profesionales (células dendríticas, células B, macrófagos, células epiteliales tímicas). Estas proteínas son los principal fuente de aloantígenos que desencadenan una respuesta inmune contra el órgano trasplantado<sup>[10]</sup>.

Se pueden definir tres tipos de rechazo de órganos vascularizados, como el riñón, basados en el tiempo que ocurren después del trasplante y las características histopatológicas (Figura 1):

**1. Rechazo hiperagudo:** ocurre en los primeros minutos después de que se anastomosan los vasos sanguíneos del receptor al injerto y es causado por anticuerpos anti-donador específicos (Ac-ADE) preexistentes en la sangre del receptor previo al trasplante (Figura 1a). Los Ac-ADE se unen a los antígenos expresados en el endotelio del injerto, lo cual induce: 1) la activación local del complemento y del endotelio vascular, y la secreción de factores procoagulantes; 2) la adhesión y la agregación plaquetaria, generando una trombosis intravascular que causa necrosis isquémica irreversible del órgano trasplantado, y finalmente, lleva a la pérdida del injerto. Actualmente, los eventos de rechazo hiperagudo se han evitado debido a las pruebas de compatibilidad que se realizan previo al trasplante<sup>[11]</sup>.

**2. Rechazo agudo:** ocurre días a semanas después del trasplante (Figura 1b). Se caracteriza por una lesión del parénquima del injerto y de los vasos sanguíneos debido a dos mecanismos inmunológicos que, pueden ocurrir solos o en combinación: i) rechazo agudo celular mediado por células T, el cual se caracteriza por una infiltración leucocitaria que causa inflamación en los túbulos renales, el intersticio y en la íntima arterial; ii) rechazo agudo humoral mediado por anticuerpos, el cual se caracteriza por la inflamación de los glomérulos renales o de los capilares peritubulares, debido a la unión de los Ac-ADE al endotelio, lo que desencadena la activación del complemento, el reclutamiento y la activación de leucocitos, y la formación de trombos<sup>[12]</sup>. Se han identificado varios factores de riesgo para el rechazo agudo e incluyen la compatibilidad de los HLA, función retardada del injerto, donante fallecido, trasplante repetido, nivel de los Ac-ADE previos al trasplante, raza y sexo<sup>[13]</sup>. Con los tratamientos actuales, se ha reportado que la incidencia de rechazo agudo es menor al 10% dentro del primer año posterior al trasplante<sup>[14]</sup>.

**3. Rechazo crónico:** ocurre más allá de tres meses post-trasplante, consiste en el deterioro lento y progresivo de la función del aloinjerto<sup>[12]</sup>. Se caracteriza principalmente por la proliferación de las células musculares lisas de la íntima arterial e incremento de miofibroblastos, lo que lleva al desarrollo de fibrosis intersticial generando una oclusión vascular (vasculopatía), y finalmente, una lesión isquémica en el injerto<sup>[12]</sup> (Figura 1c). En la actualidad, el rechazo crónico es la principal causa de pérdida de trasplante renal a largo plazo. Varios factores pueden influenciar la sobrevida del injerto a largo plazo, y estos pueden dividirse en dos<sup>[15, 16]</sup>; 1) los factores inmunológicos, los cuales están mediados por células T y/o por células B productoras de anticuerpos; 2) factores no inmunológicos, incluyen la recurrencia de la enfermedad renal inicial, el tiempo de diálisis, la edad del donador/receptor, el tipo de donador (vivo o muerto), el retraso de la función renal, una isquemia fría prolongada, efectos adversos de los tratamientos inmunosupresores, entre otros.



**Figura 1. Tipos de rechazo de órganos vascularizados trasplantados.** a) **Rechazo hiperagudo:** ocurre en los primeros minutos después del trasplante, es causado por anticuerpos anti-donador específicos preexistentes en la sangre del receptor previo al trasplante, los cuales generan una trombosis intravascular y necrosis isquémica irreversible. b) **Rechazo agudo:** ocurre días a semanas después del trasplante, y se caracteriza por una lesión del parénquima del injerto y de los vasos sanguíneos; es mediado por células T y por anticuerpos. c) **Rechazo crónico:** ocurre meses post-trasplante, consiste en el deterioro lento y progresivo de la función del órgano, puede ser mediado por células T y/o por anticuerpos; se caracteriza por el desarrollo de fibrosis intersticial y oclusión vascular.

En forma general, durante la respuesta inmune contra el órgano trasplantado se producen dos principales mecanismos inmunológicos: 1) una respuesta innata inespecífica que predomina en la fase temprana de la inflamación y una de las principales funciones que desempeña es estimular la respuesta inmune adaptativa (ver sección 1.2.1); 2) una respuesta adaptativa específica que aparece después de la respuesta innata, es principalmente regulada por las células T y las principales características de esta respuesta es que es antígeno-específica y genera memoria inmunológica (ver sección 1.2.2). En las siguientes secciones se describe a detalle la contribución del sistema innato y el adaptativo en la respuesta inmune al trasplante.

### ***1.2.1. Respuesta inmune innata en el trasplante***

El sistema inmune innato representa la primera línea de defensa para la protección contra agentes extraños, como microorganismos patógenos. Aunque la respuesta inmune adaptativa desempeña un papel primordial en el rechazo al trasplante, una considerable cantidad de investigaciones han descrito distintos mecanismos del sistema innato implicados en la respuesta contra el aloinjerto.

La activación del sistema inmune innato es una consecuencia de eventos asociados con el proceso de recuperación, preservación e implantación del órgano trasplantado, lo cual causan un deterioro inevitable del injerto conocido como daño por isquemia/reperfusión (I/R). El daño por I/R tiene como consecuencia la muerte celular y la liberación de moléculas intracelulares conocidas como patrones moleculares asociados al daño (DAMPs)<sup>[17]</sup>. Los DAMPS pueden ser reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRRs), que se encuentran expresados en las células del sistema inmune, como los receptores tipo Toll (TLRs), los receptores para productos finales de la glicosilación (RAGE) y los purireceptores (P2X7), los cuales provocan una rápida y potente respuesta inmune de manera similar a la respuesta generada por microorganismos patógenos<sup>[18]</sup>. Algunos ejemplos de estos DAMPs incluyen proteínas de organelos celulares (HMGB1, calreticulina) o de citoplasma (proteínas de choque térmico, galectinas y proteínas S100), ADN mitocondrial, nucleótidos (ATP), cristales de ácido úrico, entre otros<sup>[17]</sup>. Diversos estudios evidencian la participación de los DAMPs y los PRRs en la respuesta inmune al trasplante, principalmente causando inflamación (Tabla 1).

Posterior al reconocimiento de los DAMPs, los PRRs generan señales intracelulares que llevan a la activación de células del sistema inmune<sup>[18, 19]</sup>. En este contexto, dos estudios demostraron que la expresión de Myd88 y TRIF, proteínas adaptadoras que participan en la señalización río abajo de los TLR, es esencial para que se lleve a cabo el rechazo de los aloinjertos<sup>[20, 21]</sup>. En humanos, los niveles de expresión de Myd88 se han encontrado significativamente incrementados en muestras de pacientes con rechazo agudo y crónico<sup>[22]</sup>. La señalización intracelular desencadenada por la interacción de DAMPs-PRRs induce la producción de citocinas y el aumento de la expresión de moléculas relacionadas con función celular (ej. moléculas del MHC, coestimuladoras, receptores de quimiocinas, etc.)<sup>[18, 19]</sup>.

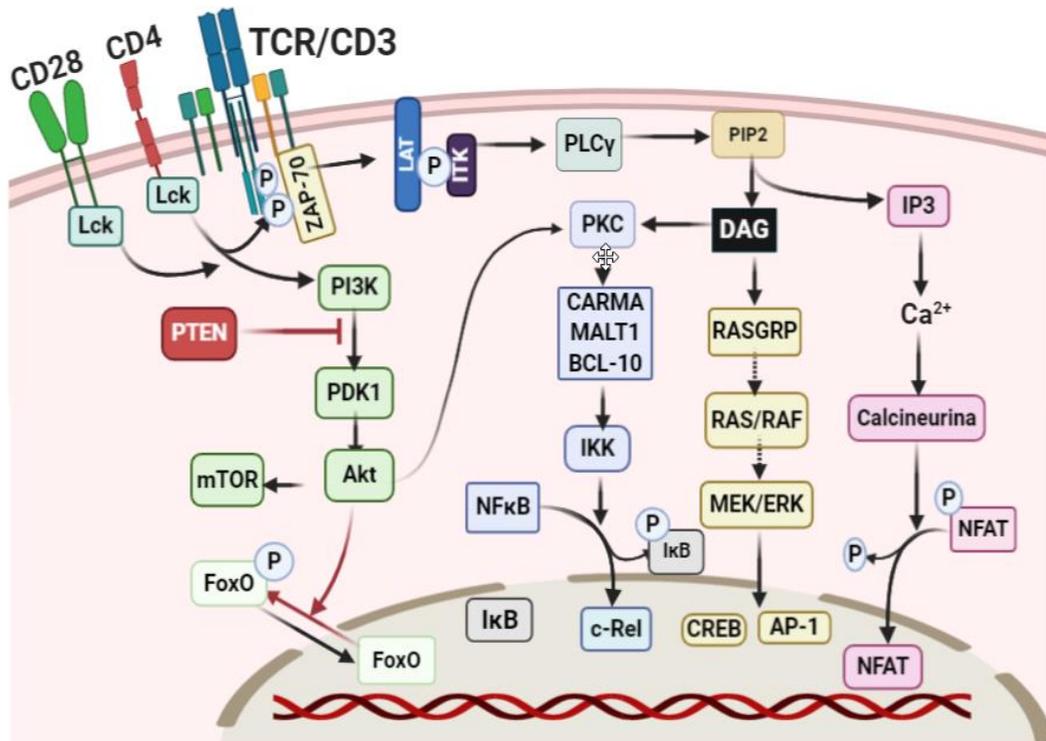
**Tabla 1 | Participación de los DAMPs y los PRRs en la respuesta inmune al trasplante.**

DAMP	Evidencia
<b>HMGB1</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Reconocida por TLR2/4 y RAGE para inducir una respuesta inflamatoria<sup>[17, 18]</sup>.</li><li>• Incremento de su expresión en biopsias renales durante las primeras horas peritransplante renal<sup>[23, 24]</sup> y en pacientes con rechazo renal crónico<sup>[25]</sup>.</li><li>• En modelos de ratón, la neutralización de las proteínas HMGB1 protege al riñón del daño por I/R<sup>[26, 27]</sup>, y prolonga la supervivencia de injertos cardiacos<sup>[28]</sup>.</li></ul>
<b>ATP</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Inicia una respuesta inflamatoria al interactuar con los receptores P2X7<sup>[29]</sup>.</li><li>• En modelos animales, el bloqueo de los receptores P2X7 disminuye el daño renal por I/R<sup>[29]</sup> y prolonga la supervivencia de aloinjertos de piel y corazón<sup>[30, 31]</sup>.</li></ul>
<b>Proteínas de choque térmico</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Inducen inflamación durante la lesión renal por I/R después de ser reconocidas por los TLR2/4<sup>[32]</sup>.</li><li>• Incremento de los niveles séricos en pacientes con rechazo renal agudo<sup>[33]</sup>.</li></ul>
<b>Ácido hialurónico</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Es reconocido por TLR2/4 y participan en el daño renal por I/R<sup>[34]</sup>.</li><li>• Se encuentra incrementado en pacientes con rechazo renal agudo<sup>[35]</sup>.</li></ul>

Una vez activadas, las células inmunes innatas no solo participarían en el daño por I/R, sino también en el rechazo agudo y crónico (revisado en <sup>[36]</sup>). Estas células incluyen los neutrófilos, las células NK, los monocitos, los macrófagos, y las células dendríticas (CDs). Dentro del injerto, estos leucocitos participarían en el rechazo mediante diversos mecanismos, incluyendo<sup>[36]</sup>: la producción de citocinas inflamatorias (IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, IL-23, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) y quimiocinas (CCL2, CCL5, CXCL10); la citotoxicidad celular, mediante la producción de especies reactivas de oxígeno, granzimas y perforinas; y de manera importante, participarían en el reclutamiento y la activación de las células del sistema inmune adaptativo. En este último punto, las CDs tendrían una función primordial ya que son consideradas las células presentadoras de antígeno más eficientes para activar las células T<sup>[37]</sup>. En el contexto del daño por I/R, los DAMPs y las citocinas inflamatorias (p. ej. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1) inducen la maduración de las CDs aumentando su expresión de moléculas del MHC (clase I y II) y coestimuladoras (ej. CD80 y CD86), por lo tanto, incrementa su capacidad para presentar antígenos y activar las células T en el ganglio y/o en el injerto<sup>[36, 37]</sup>. Asimismo, este mismo microambiente inflamatorio incrementa la expresión de receptores de quimiocinas (ej. CCR7, CXCR4) y moléculas de adhesión (ej. LFA1) en las CDs, lo cual les permite migrar a los ganglios linfáticos donde interactúan y activan las células T aloantígeno-específicas<sup>[38]</sup>. Este proceso es esencial para iniciar la respuesta inmune adaptativa al trasplante.

### 1.2.2. Respuesta inmune adaptativa en el trasplante

La respuesta inmune adaptativa está mediada por las células T y B, pero a diferencia de la respuesta innata, estas células tienen la capacidad de reconocer de manera específica las diferencias presentes en la estructura de las proteínas alogénicas. Esta especificidad es conferida gracias al amplio repertorio de los receptores de antígeno (rango de  $10^7$  a  $10^9$ ) que adquieren las células T y B durante su ontogenia<sup>[10]</sup>. Las células T vírgenes o naive pueden ser activadas durante una respuesta inmune y esta activación requiere por lo menos tres señales, que son reconocidas por los receptores expresados en la membrana plasmática y se transducen en cambios bioquímicos intracelulares (Figura 2, revisado en<sup>[10]</sup>).



**Figura 2. Vías de señalización del TCR.** La interacción de los complejos TCR- $\alpha\beta$ /CD3 y los correceptores (CD4 o CD8) con el complejo péptido-MHC activa la cinasa de tirosinas Lck. La Lck fosforila la cadena CD3 $\zeta$  en los motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina (ITAM). Los ITAM fosforilados reclutan la cinasa ZAP-70 y se convierte en sustrato de Lck. La ZAP-70 fosforilada adquiere la capacidad de cinasa de tirosina y fosforila proteínas adaptadoras como LAT. La LAT fosforilada recluta la fosfolipasa C- $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) y se activa mediante las cinasas de tirosinas, incluida ITK que también es reclutada por LAT fosforilada. La hidrólisis de fosfatidil inositol bisfosfato (PIP2) por PLC $\gamma$  libera el diacilglicerol (DAG) y el inositol trifosfato (IP3). El IP3 incrementa la concentración de calcio intracelular, lo cual activa la calcineurina, la cual desfosforila NFAT para permitir su translocación al núcleo. La formación de DAG conduce a la activación de una cascada de fosforilación de serina/treonina cinasas (cascada de MAP cinasas) que al final resulta en la translocación nuclear de cinasas ERK (AP-1, CREB). El DAG activa el complejo CARMA/BCL-10/ MALT1 que conduce a la fosforilación de la cinasa de I $\kappa$ B (IKK). IKK activa fosforila a I $\kappa$ B, lo que lleva a la degradación de I $\kappa$ B y la liberación de NF- $\kappa$ B al núcleo. PI3K activado por TCR cataliza la formación de PIP3 a partir de PIP2 asociado a membrana; la fosfatasa PTEN antagoniza la formación de PIP3. PIP3 activa PDK1, que fosforila y activa la cinasa Akt. Akt activa promueve la activación de mTOR y la vía PKC-CARMA-NF $\kappa$ B y, bloquea la regulación transcripcional dependiente de FoxO. Los factores de transcripción NFAT, NF $\kappa$ B y los activados por la vía MAPK cooperan para regular la transcripción de genes, como IL-2 o aumento de la expresión de CD25, críticos para la activación de las células T.

La unión del complejo TCR/CD3 y un correceptor CD4 o CD8 de las células T con el complejo péptido-MHC expresado en una CPA, es imprescindible para el inicio de la activación del linfocito T<sup>[10]</sup>. Además, para la eficaz activación de células T se requiere que la misma CPA genere una segunda señal, la señal coestimuladora, cuyo efecto principal es incrementar la señalización intracelular. Las moléculas coestimuladoras mejor conocidas son miembros de la familia B7, CD80 y CD86, que reconocen receptores de la familia CD28 expresados en las células T<sup>[10]</sup>. Los receptores y correceptores activan varias vías de señalización intracelular (Figura 2), que tienen como resultado final cambios en la expresión de moléculas de superficie (ej. moléculas de adhesión, receptores citocinas y quimiocinas), la síntesis de citocinas, la proliferación celular y la diferenciación en células T efectoras y/o de memoria<sup>[10]</sup>. En el caso de las células T CD4<sup>+</sup>, una tercera señal es proporcionada principalmente por las citocinas presentes en el microambiente inflamatorio, lo cual induce la diferenciación a subgrupos efectoras denominados células T cooperadoras (Th).

### **Rechazo al trasplante mediado por células T**

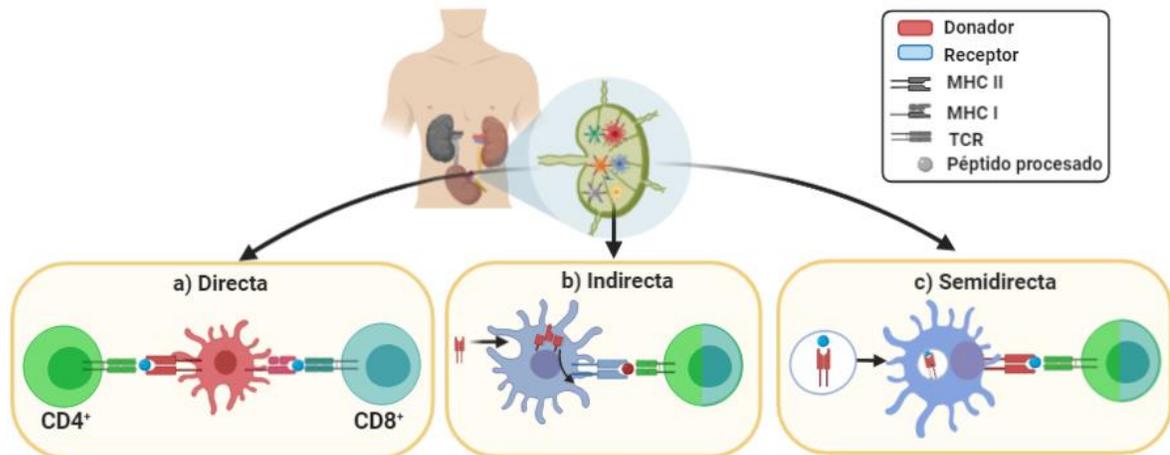
Actualmente es ampliamente aceptado que la respuesta inmune adaptativa mediada por las células T, constituye el punto crítico que determina el éxito del trasplante renal a corto y largo plazo. El reconocimiento de los aloantígenos (alorreconocimiento) por las células T es posible gracias a la participación de las CPAs, principalmente las CDs, tanto del receptor como del donador. Se han descrito tres vías de alorreconocimiento (Figura 3):

**1. Vía directa:** En esta vía, las CDs del donador presentes en el órgano trasplantado maduran y migran a los órganos linfoides secundarios del receptor, en los cuales las células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> del receptor reconocen los aloantígenos en las moléculas intactas del MHC I y II, respectivamente, expresados en las CDs del donador (Figura 3a)<sup>[37, 39, 40]</sup>. La frecuencia de células T del receptor con aloespecificidad directa se ha estimado entre 1-10%, una proporción alta en comparación con antígenos convencionales<sup>[37, 40]</sup>. Se han propuesto dos modelos no mutuamente excluyentes para explicar este fenómeno<sup>[40, 41]</sup>. El primero, el modelo de alta densidad de determinantes, postula que los TCRs del receptor pueden reconocer los aminoácidos polimórficos del MHC alogénico expuestos, independientemente del péptido unido a la molécula del MHC. El segundo, el modelo de múltiples complejos binarios, se basa en la habilidad de cada molécula del MHC alogénica para presentar diversos

péptidos que pueden servir como ligandos para varias clonas de células T. El análisis cristalográfico de la interacción entre una célula T aloespecífica y un MHC allogénico sugiere que la alta frecuencia precursora de células T aloespecíficas vía directa se debe principalmente al reconocimiento múltiple de complejos binarios<sup>[40]</sup>.

**2. Vía indirecta:** en esta vía, las CDs del receptor capturan, procesan y presentan aloantígenos como péptidos en sus moléculas del MHC. Las CDs del receptor, que expresan moléculas del MHC clase I y II, pueden presentar los aloantígenos a las células T CD8<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup> (Figura 3b)<sup>[40, 41]</sup>. Dado que el aloinjerto puede expresar antígenos de histocompatibilidad mayor y menor, se podría generar un gran número de alopéptidos que serían presentados de manera indirecta. El mapeo de epítomos y estudios de repertorio de los TCRs revelaron que la respuesta indirecta inicialmente está dirigida a pocos epítomos generalmente ubicados dentro de las regiones polimórficas del MHC allogénico. Progresivamente, la alorespuesta indirecta tiende a extenderse a nuevos péptidos del MHC allogénicos, especialmente de la clase I<sup>[40, 41]</sup>.

**3. Vía semidirecta:** este tipo de alorreconocimiento se caracteriza por la capacidad de las CDs del receptor para presentar moléculas del MHC I y II del donador estructuralmente intactas adquiridas por contacto de célula a célula o por fusión con exosomas del donante. En esta vía, las células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> aloespecíficas son estimuladas por alorreconocimiento directo e indirecto (Figura 3c)<sup>[40, 41]</sup>.

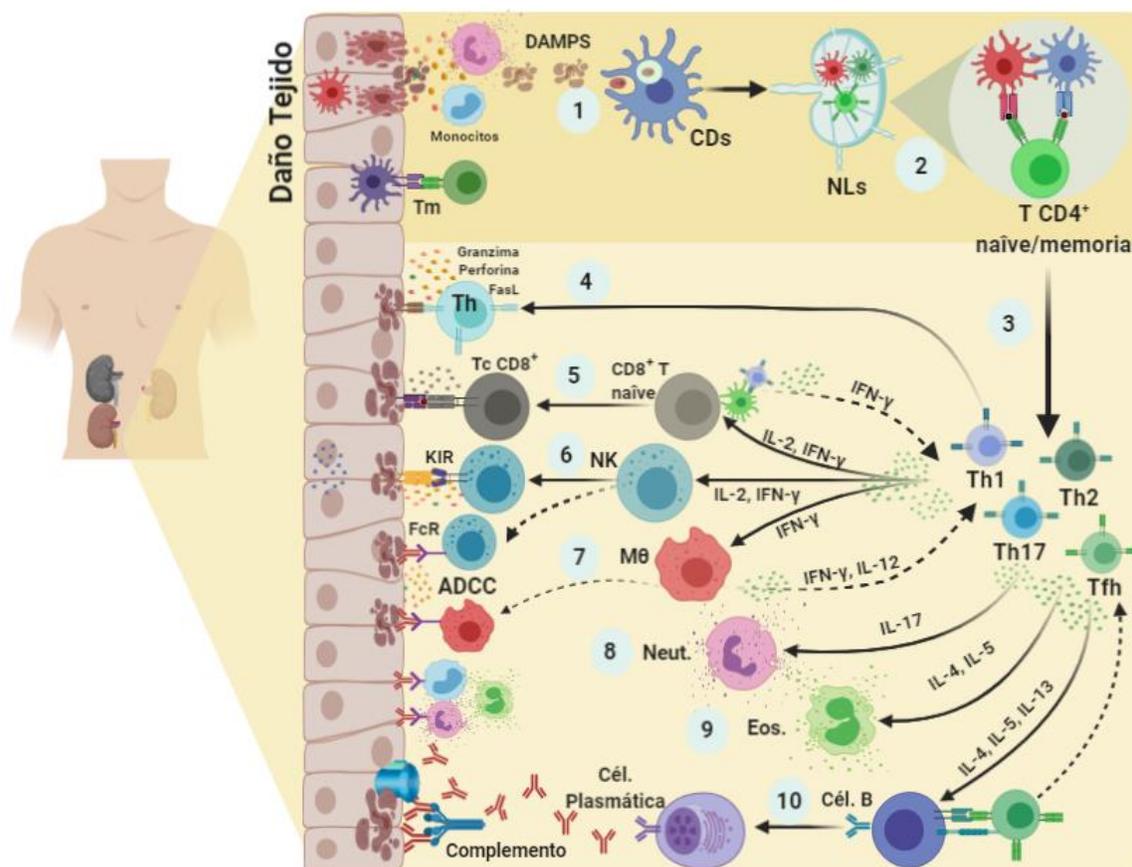


**Figura 3. Vías de reconocimiento del aloantígeno por las células T.** a) En la vía de alorreconocimiento directa, el aloantígeno se reconoce en una proteína intacta del MHC clase II o clase I en la superficie de las células presentadoras de antígeno del donante (CPA) por las células T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, respectivamente. b) En el alorreconocimiento indirecto, el aloantígeno del injerto (típicamente antígenos del MHC) es internalizado por la CPA del receptor (típicamente una CD), procesado y presentado como péptidos en las moléculas del MHC del receptor. c) En la vía semidirecta, el complejo MHC-aloantígeno es adquirido por las CDs del receptor, pero en lugar de presentarse como alopéptido procesado, se vuelve a presentar como una proteína conformacionalmente intacta.

En los órganos sólidos vascularizados, como el riñón y el corazón, el rechazo agudo es esencialmente iniciado por las células T CD4<sup>+</sup> con alorreconocimiento directo, lo cual es asociado con el rápido tráfico de las CDs del donador a los órganos linfoides secundarios<sup>[40-42]</sup>. Estudios en ratones y en humanos sugieren que las respuestas de las células T CD4<sup>+</sup> de la vía directa se limitan a las primeras semanas después del trasplante, lo cual se correlaciona con la vida media de las CDs de donador<sup>[40]</sup>. Adicionalmente, existe evidencia que estos órganos vascularizados pueden ser rápidamente infiltrados por células T aloespecíficas de memoria (T<sub>m</sub>) del receptor (presumiblemente activadas vía directa) que mediarían el rechazo agudo<sup>[43]</sup>, aún en ausencia de tejidos linfoides secundarios<sup>[44]</sup>, lo que concuerda con la habilidad de las células T<sub>m</sub> de migrar y proliferar en tejidos no linfoides<sup>[45]</sup>. Éstas células T<sub>m</sub> serían generadas por mimetismo con antígenos microbianos o exposición previa a moléculas del MHC alogénicas después de eventos como el embarazo o la transfusión sanguínea<sup>[43]</sup>. Aunado al anterior mecanismo, a través de la microscopía intravital recientemente se ha revelado que las células T aloespecíficas se reclutan y transmigran en el órgano alogénico solo cuando su antígeno específico se encuentra expresado en el riñón<sup>[46]</sup>. Este mecanismo es dependiente de la presencia de las CDs en el aloinjerto, ya que cuando son eliminadas selectivamente o son deficientes de moléculas del MHC, disminuyen las interacciones células T-CDs, lo que trae como consecuencia una menor supervivencia y proliferación de las células T infiltrantes y, como resultado final, una mayor sobrevida del aloinjerto<sup>[46, 47]</sup>. Finalmente, es importante resaltar que la mayoría de los órganos sólidos vascularizados son rechazados crónicamente, un proceso asociado con la fibrosis progresiva del tejido del injerto y la oclusión de los vasos sanguíneos, donde las respuestas de células T CD4<sup>+</sup> con activación indirecta predominan progresivamente<sup>[41]</sup>.

Una vez que células T aloespecíficas son activadas por las células presentadoras de antígeno, el microambiente inflamatorio lleva la diferenciación de distintas subpoblaciones efectoras incluyendo las células T CD4<sup>+</sup> cooperadoras tipo 1 (Th1), Th2, Th17 y foliculares (T<sub>fh</sub>), cada una de las cuales contribuye al rechazo agudo y crónico mediante diversos mecanismos (Figura 4, revisado en<sup>[48]</sup>). Por ejemplo, las células Th1 inducen la estimulación de la respuesta humoral mediada por células B, la diferenciación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTL), la activación de las células NK y macrófagos, y muerte celular través de la expresión de FasL, y la producción de granzimas y perforinas. Mientras tanto, la IL-17 producida por

las células Th17 estimula la producción de citocinas y quimiocinas inflamatorias que conducen al reclutamiento de neutrófilos y macrófagos. Las células Th2 y Tfh promueven el reclutamiento de eosinófilos, y de manera importante inducen la maduración y diferenciación de células B a células plasmáticas productoras de anticuerpos ADE. A su vez, las células B expresan moléculas del MHC I y II, y coestimuladoras, por lo tanto, tienen la capacidad de promover la activación y diferenciación de las células T aloespecíficas<sup>[49]</sup>. Por ello, el entendimiento de la contribución y regulación de cada uno de estos mecanismos podría ofrecer oportunidades para intervenciones inmunológicas en el trasplante de órganos sólidos.

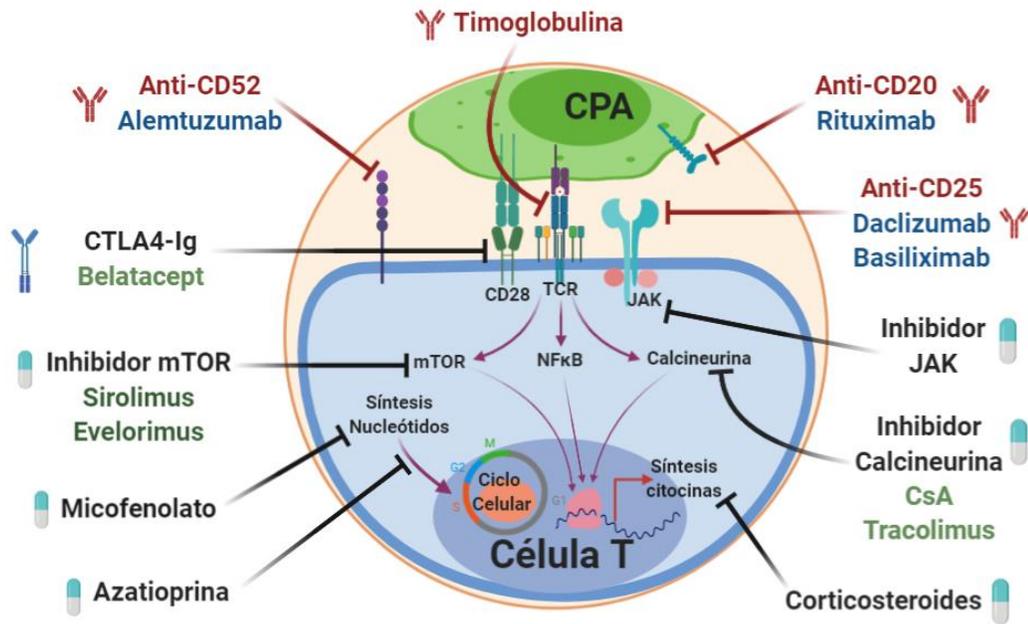


**Figura 4. Participación de las células T CD4<sup>+</sup> en la respuesta inmunológica al aloinjerto.** El daño por I/R generado durante el trasplante, induce la producción de citocinas inflamatorias y DAMPs los cuales inducen el reclutamiento y/o la maduración de células dendríticas (CDs) derivadas de donantes y receptores, así como otros leucocitos (1). Las CDs captan/procesan el aloantígeno y migran a nódulos linfoides (NLs) donde presentan el aloantígeno a las células T aloreactivas (2). Las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes/memoria se diferencian en células T cooperadoras tipo 1 (Th1), Th2, Th17 y Tfh (3), las cuales modulan la respuesta inmune al aloinjerto mediante: la inducción de la muerte celular en el injerto a través de FasL, y la producción de granzimas y perforinas (4); promoviendo la diferenciación y la proliferación de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas (5); reclutando y activando células NK (6), macrófagos (Mφ) (7), neutrófilos (8) y eosinófilos (9); finalmente, inducen la diferenciación de células B a células plasmáticas productoras de anticuerpos anti-donador específicos (10). A su vez, cuando los anticuerpos se reconocen el aloantígeno en el injerto activan la cascada de complemento, inducen el reclutamiento de otros leucocitos y generan citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediado por células NK y macrófagos.

### **1.3. Fármacos inmunosupresores y sus efectos adversos**

Para suprimir la respuesta inmune del receptor contra el órgano trasplantado, los pacientes requieren un régimen inmunosupresor perioperatorio, la terapia de inducción, y postoperatorio, la terapia de mantenimiento (Figura 5, revisado en<sup>[50]</sup>). La terapia inmunosupresora de inducción proporciona una inmunosupresión intensa a corto plazo durante los periodos perioperatorios y postoperatorios inmediatos. En general, los agentes de inducción actúan eliminando las células T, lo que ha reducido las tasas de rechazo agudo y una mayor supervivencia del aloinjerto<sup>[50]</sup>. Se utiliza un grupo selecto de agentes para la terapia de inducción incluyendo alemtuzumab (anti-CD52), timoglobulina (anticuerpos policlonales anti-timocitos humanos) y basiliximab o daclizumab (anti-CD25)<sup>[50]</sup>.

La inmunosupresión de mantenimiento ocurre en el período postoperatorio, el cual en la mayoría de los pacientes es administrado de por vida y consiste en múltiples medicamentos que se dirigen a diferentes mecanismos de la respuesta inmune<sup>[50]</sup> (Figura 5). Con la introducción de la ciclosporina A (CsA), un inhibidor de la calcineurina (iCN), a principios de la década de 1980 condujo a una mayor supervivencia del paciente y del aloinjerto y redujo las tasas de rechazo agudo<sup>[50]</sup>. Actualmente, la mayoría de los centros de trasplante utilizan un régimen de tres medicamentos que incluye el tacrolimus (un iCN de segunda generación), el agente anti-proliferativo micofenolato y un corticosteroide. Estudios recientes sugieren un beneficio de regímenes basados en un inhibidor de mTOR como rapamicina (sirolimus) o everolimus para preservar la función renal a largo plazo<sup>[50]</sup>. Además, se han desarrollado nuevos fármacos inmunosupresores. Belatacept (BLT) es una molécula quimérica CTLA-4-Ig que bloquea la coestimulación de las células T, la cual fue aprobada en 2011 para la terapia inmunosupresora de mantenimiento en pacientes con trasplante de riñón en Estados Unidos de América y la Unión Europea<sup>[51]</sup>. Durante un estudio clínico de siete años, los resultados mostraron que la función renal medida por tasas de filtración glomerular (TFG) fueron significativamente más altas en los pacientes tratados con BLT en comparación con pacientes tratados con CsA<sup>[52]</sup>. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la supervivencia del paciente y del injerto entre los pacientes tratados con CsA y BLT. Además, se observó una mayor tasa de rechazo agudo en los pacientes tratados con BLT dentro del primer año post-trasplante<sup>[52, 53]</sup>.



**Figura 5. Mecanismos de acción de agentes inmunosupresores.** Los agentes inmunosupresores usados en las terapias de inducción en los pacientes con trasplante están dirigidos a eliminar las células T mediante uso de anticuerpos (anti-CD3/-CD52/-CD25) o inhibiendo la coestimulación con proteínas quiméricas (CTLA-4-Ig). Otro grupo de inmunosupresores, usados en terapias de mantenimiento, están dirigidos a inhibir la diferenciación y proliferación de células T como inhibidores de calcineurina (ciclosporina A, tracolimus), inhibidores de mTOR (sirolimus, everolimus), anti-proliferativos (micofenolato, azatioprina) y corticosteroides, así como señalización de citocinas (inhibidor JAK).

A pesar de las excelentes tasas de supervivencia del injerto a corto plazo (>90% dentro del primer año del trasplante)<sup>[50]</sup>, actualmente la supervivencia del injerto y del paciente disminuyen gradualmente a lo largo del tiempo<sup>[54]</sup>. En este contexto, un estudio retrospectivo de cuatro décadas realizado en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMN-SZ), reportó que las tasas de sobrevida del injerto renal en 1, 5 y 10 años post-trasplante fueron del 90%, 76% y 61%, respectivamente, con una media de supervivencia de 12.8 años<sup>[14]</sup>. Esta disminución de las tasas de supervivencia puede deberse a dos principales factores. Primero, debido a que la inmunosupresión no elimina específicamente a las células T aloespecíficas, por lo que, las actuales terapias inmunosupresoras no han podido evitar el rechazo crónico. Segundo, los regímenes inmunosupresores administrados a largo plazo están asociados con una amplia gama de complicaciones (Tabla 2), principalmente enfermedades cardiovasculares, cáncer e infecciones por microorganismos patógenos, las cuales a su vez actualmente representan aproximadamente el 30%, 24% y 13%, respectivamente, de la mortalidad general en receptores renales<sup>[54]</sup>.

**Tabla 2 | Efectos adversos de los fármacos inmunosupresores.**

Fármaco	Efectos Adversos
<b>Anti-CD25</b> (basiliximab, daclizumab)	Anafilaxia, reacciones alérgicas, mayor riesgo de infección.
<b>Anti-CD52</b> (alemtuzumab)	Mayor riesgo de infección, alteración gastrointestinal.
<b>Timoglobulina</b>	Linfopenia, anafilaxia, shock, broncoespamos, mayor riesgo de infección.
<b>Corticosteroides</b>	Retención de líquidos, diabetes mellitus, hipertensión, retraso crecimiento, hiperlipidemia, osteopenia, menor cicatrización de heridas.
<b>Inhibidores de Calcineurina (iCN)</b>	Nefrotoxicidad, neurotoxicidad, hipertensión, hiperlipidemia e hiperpotasemia, diabetes mellitus, mayor 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<sup>[55]</sup>.

Debido a lo anterior, la meta final del trasplante es lograr la tolerancia, un estado fisiológico en el cual se crea un entorno inmunológico que favorece la regulación, respaldando la supervivencia del aloinjerto, sin interferir con los mecanismos cruciales de vigilancia inmunológica y de esta manera eliminar la necesidad de usar fármacos inmunosupresores. De hecho, ha habido reportes de un estado de tolerancia postoperatoria espontánea en pacientes con trasplante de riñón<sup>[56]</sup> e hígado<sup>[57]</sup>. En tales casos, los pacientes renuncian a la necesidad de la terapia inmunosupresora, mientras mantienen la función normal del injerto. Sin embargo, este fenómeno es raro, y en el contexto del trasplante de hígado se ha demostrado que ocurre años después del trasplante<sup>[57]</sup>. Además, se ha sugerido que la terapia inmunosupresora dificulta el desarrollo de la tolerancia postoperatoria mediante la supresión indiscriminada de células inmunes que se consideran necesarias para la inducción de la tolerancia.

En la búsqueda de la panacea de la inmunología del trasplante, se ha dirigido un esfuerzo considerable en la búsqueda de células inmunes reguladoras que induzcan tolerancia. Durante las últimas décadas ha habido innumerables descubrimientos de células inmunorreguladoras que abarcan la mayoría de los linajes del sistema inmune. No obstante, una población en particular que ha recibido mucha atención ha sido las células T reguladoras (Tregs), debido a que tienen la capacidad de inducir tolerancia de manera antígeno-específica.

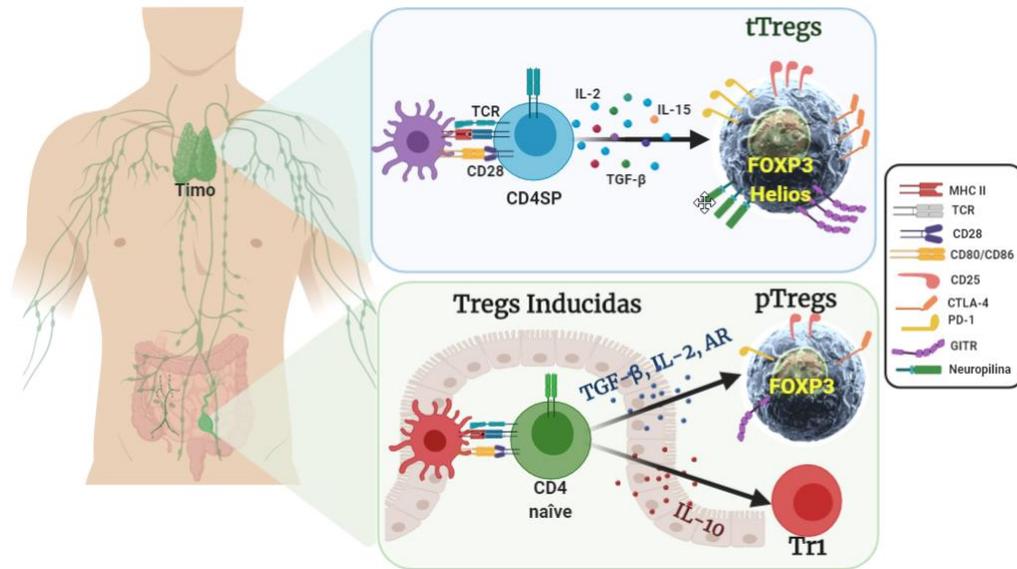
## 1.4. Células T reguladoras

Las células T CD4<sup>+</sup> reguladoras (Tregs) son una subpoblación especializada de linfocitos requeridos para la inducción y mantenimiento de la tolerancia inmunológica. Estas células pueden suprimir la activación y las funciones efectoras de una amplia gama de células del sistema inmune, incluyendo los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, linfocitos B, células NK, monocitos, neutrófilos y CDs, tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>[58]</sup>. Esta diversidad de poder controlar la respuesta inmune hace que las células Tregs sean esenciales para: a) prevenir el desarrollo 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) participar en la reparación y la regeneración del tejido dañado; e) inducir y mantener la tolerancia materno-fetal y al aloinjerto<sup>[58, 59]</sup>. Debido a todas estas funciones, ha habido un gran interés en poder desarrollar inmunoterapias basadas en el uso de células Tregs para el tratamiento de inmunopatologías, incluyendo el rechazo al injerto.

Aunque existen varias subpoblaciones de células Tregs y por lo tanto, gran heterogeneidad en su fenotipo, la subpoblación mayoritaria y mejor estudiada se caracteriza por la expresión del factor de transcripción FOXP3, el cual es indispensable para su desarrollo y el mantenimiento de su función supresora<sup>[60]</sup>. La importancia de este factor de transcripción se pone en evidencia en experimentos donde mutaciones en el gen *Foxp3* conllevan una autoinmunidad hiperproliferativa fatal. En ratones, la mutación espontánea “Scurfy”, que induce una pérdida de la función del FOXP3, induce la ausencia completa de Tregs conduciendo a la muerte entre la tercera y cuarta semana de edad<sup>[60]</sup>. En humanos, pacientes con enfermedad autoinmune multisistémica IPEX presentan un fenotipo poliendocrino autoinmune que se relaciona con la pérdida de células Tregs funcionales<sup>[60]</sup>.

### 1.4.1. Ontogenia de las células Tregs

Las células Tregs FOXP3<sup>+</sup> se han clasificado, de acuerdo al lugar anatómico de su generación, en células Tregs de origen tímico (tTregs) y células Tregs generadas en la periferia (pTregs) (Figura 6). Además, cuando las células Tregs son generadas *in vitro* a partir de células T vírgenes se denominan células iTregs (*in vitro induced Tregs*)<sup>[61]</sup>. Existen diferencias fundamentales en las señales que favorecen el desarrollo de cada subpoblación y que se abordan a continuación.



**Figura 6. Ontogenia de las células T reguladoras.** Las células T reguladoras (Tregs) de origen tímico (tTregs) se desarrollan a partir de timocitos CD4 simples positivos (CD4SP) y se caracterizan por la expresión constitutiva del FOXP3 y CD25, así como altos niveles del Helios, CTLA-4, GITR, neuropilina 1 y PD-1. Para su diferenciación las tTregs requieren fuertes señales a través de su TCR y coestimulación por CD28, y por citocinas incluyendo IL-2, IL-15 y TGF-β. Las Tregs periféricas (pTregs) se generan en escenarios extratímicos tolerogénicos a partir de células T CD4<sup>+</sup> vírgenes y se caracterizan por expresar FOXP3, CD25, CTLA-4, así como menores niveles de expresión de Helios y neuropilina; para su generación requieren señales a través del TCR y de citocinas IL-2 y TGF-β, pero coestimulación subóptima del CD28. Otro grupo subgrupo de Tregs inducidas son las Tregs tipo 1 (Tr1) que se generan en presencia de IL-10, y se caracterizan por la expresión de LAG-3, CD49b, producción de IL-10 y no expresar FOXP3.

Actualmente, se sabe que la diferenciación de las células tTregs requiere señales a través del TCR, moléculas coestimuladoras y receptores de citocinas. Diversas investigaciones han respaldado el papel de la señalización del TCR de alta afinidad en el desarrollo de las células tTregs. Usando ratones que expresan proteína fluorescente verde (GFP) bajo el promotor del gen *Nr4a1*, cuya expresión es inducida por la intensidad de la señal del TCR, se reveló que las células tTregs tienen una mayor expresión de la GFP en comparación con las células T CD4<sup>+</sup> convencionales (Tconv) no reguladoras<sup>[62]</sup>. Adicionalmente, estudios realizados en ratones deficientes de las proteínas RAG (que son incapaces de recombinar las cadenas TCRα para generar los TCRαβ maduros) y/o que contienen TCR transgénicos específicos para péptidos extraños como OVA, tienen una disminución o ausencia de células tTregs<sup>[61, 63, 64]</sup>. Estos mismos modelos de estudio han mostrado que las células tTregs requieren de una señal de alta avidez mediada por el TCR y la expresión del antígeno en las células epiteliales tímicas para ser seleccionadas<sup>[61, 63, 64]</sup>. Se ha propuesto que esta alta avidez es cercana a la que desencadena la selección negativa de los timocitos<sup>[63]</sup>. De hecho, se ha observado que la reducción de las señales inducidas por el TCR se correlaciona con una

disminución de las células tTregs, mientras que, el aumento de la intensidad de la señal del TCR favorece su generación<sup>[63]</sup>. Consistente con los conceptos anteriores, las células tTregs requieren la activación de señales intracelulares fuertes a través del TCR para favorecer su desarrollo y homeostasis (Figura 2 y 7). En este contexto, mutaciones o deficiencias de moléculas involucradas en la señalización río abajo del TCR como LAT, PLC $\gamma$ 1, ZAP-70, PKC- $\theta$ , Bcl10, Lck, CARMA1, IKK $\beta$  o NF-KB/Rel, conducen al desarrollo de autoinmunidad debido a un defecto en el desarrollo y/o el mantenimiento de las células tTregs<sup>[61]</sup> (Figura 7).

Además de las señales del TCR, las señales co-estimuladoras a través del CD28 tienen un papel esencial en la diferenciación de las células tTregs. Ratones deficientes del CD28 o CD80/CD86 presentan una disminución en los números de las células tTregs en el timo y en órganos linfoides periféricos<sup>[64]</sup>. Cabe resaltar que el dominio de unión a Lck en la cola citoplásmica del CD28 y la activación de c-Rel (miembro de la familia del NF- $\kappa$ B) río abajo de la señalización del CD28 son críticos para la inducción de la expresión del FOXP3<sup>[65-67]</sup>.

Por otro lado, existen vías de señalización activados a través del TCR y CD28 que antagonizan la expresión del FOXP3. Específicamente, la activación de AKT, a través de PI3K y mTORC2, lleva a la fosforilación de las proteínas FoxO1 y FoxO3, inhibiendo su translocación al núcleo (Figura 2)<sup>[68]</sup>. Las proteínas FoxO se unen al locus de *Foxp3* y cooperan para inducir la expresión del FOXP3<sup>[69, 70]</sup>. De esta manera, la vía PI3K/AKT/mTOR inhibe la generación de las células tTregs probablemente a través de la exportación nuclear de factores de transcripción de la familia FoxO (Figura 7). En conjunto, estos datos sugieren un rol coordinado entre las señales del TCR y del CD28 para la diferenciación de las células Tregs en el timo.

Aunado a los mecanismos moleculares mencionados anteriormente, se ha documentado que señales generadas por receptores de citocinas son importantes para la generación de las células tTregs. Se ha propuesto que la generación de las células tTregs ocurre en un proceso de dos pasos: el primero depende de la alta avidéz de las señales del TCR que da lugar a la generación de timocitos precursores CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup>; y el siguiente paso, independiente del TCR, estos timocitos precursores expresan FOXP3 en respuesta a citocinas como IL-2 e IL-15, las cuales inducen señales a través de sus receptores y activan el factor de

transcripción STAT5 (Figura 7)<sup>[64]</sup>. TGF- $\beta$  también participa en el desarrollo tímico de Tregs promoviendo la supervivencia de los timocitos precursores de células tTregs y señalizando a través de su receptor para inducir la expresión del FOXP3<sup>[64]</sup>.

Por otra parte, las células iTregs y las pTregs 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 las células Tregs involucra un mecanismo dependiente de TGF- $\beta$ . De esta manera, la estimulación de las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes a través de su TCR y en presencia de TGF- $\beta$  genera *de novo* una subpoblación de células T que son fenotípicamente similares a las células tTregs, en cuanto a la expresión del CD25, CTLA-4 y FOXP3<sup>[71, 72]</sup>. Específicamente, TGF- $\beta$  a través de su receptor activa al factor de transcripción SMAD3, el cual se une al gen *Foxp3* y, en conjunto con otros factores, induce su expresión (Figura 7)<sup>[71, 72]</sup>.

El análisis de repertorios de los TCRs en las células Tregs ha revelado que la especificidad del TCR que presentan las células pTregs difiere en su mayoría con los TCRs de las células tTregs, lo que sugiere que cierto tipo de antígenos favorecen la generación de células Tregs en periferia y que ambas poblaciones tendrían funciones no redundantes<sup>[71, 72]</sup>. Además, la intensidad de las señales a través de su TCR y moléculas coestimuladoras en las células pTregs parecen ser diferentes al de las células tTregs. Se ha observado que la inducción de células Tregs *in vitro* es favorecida por señales subóptimas del TCR o señales óptimas en presencia de alta concentración de TGF- $\beta$ <sup>[71, 72]</sup>. Mientras que, en periferia el entrecruzamiento del CD28 inhibe la inducción del FOXP3 en células T vírgenes bajo estimulación con TGF- $\beta$ ; por el contrario, un estímulo inhibitorio por medio del CTLA-4 (regulador negativo de la señalización del CD28 y del TCR) es necesario para generar las células pTregs y las iTregs en presencia de TGF- $\beta$ <sup>[71, 72]</sup>. *In vivo* existen condiciones tolerogénicas donde la estimulación crónica con bajas dosis de antígeno en un microambiente no inflamatorio favorece el desarrollo de las células pTregs FOXP3<sup>+</sup>. Por ejemplo, el microambiente intestinal es rico en una subpoblación de CD caracterizadas por la expresión de CD103 y la alta producción de ácido retinoico y TGF- $\beta$ , ambas moléculas inducen la expresión de FOXP3 en las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes; de esta manera, la

exposición crónica a antígenos de la dieta y de la flora bacteriana comensal favorece la generación de células pTregs específicas<sup>[71, 72]</sup>.

#### ***1.4.2. Regulación transcripcional y epigenética de la expresión del FOXP3***

Factores de transcripción activados río abajo del TCR, CD28 y de los receptores de citocinas (IL-2 y TGF- $\beta$ ), se unen a la región promotora y a secuencias no codificantes conservadas (llamadas CNS0-3) en el locus de *Foxp3* para regular su transcripción (Figura 7). Además de la regulación mediada por factores de transcripción, la expresión del FOXP3 en las células Tregs está bajo un control epigenético. La desmetilación de citosinas combinado con modificaciones permisivas de las histonas, establecen una estructura de la cromatina abierta que favorece la expresión del FOXP3 en las células Tregs. Dentro del locus de *Foxp3*, el promotor y las secuencias no codificantes conservadas son las principales regiones reguladas epigenéticamente, por lo tanto, son necesarias para la estabilidad de la expresión del FOXP3<sup>[60, 73-77]</sup>. A continuación, se describen brevemente cada una de las regiones.

##### ***Promotor***

El promotor de *Foxp3* se encuentra a 6.5 kb (kilobases) río arriba del exón 1 y aproximadamente a 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, c-Rel, STAT5, y Nr4a<sup>[73, 77]</sup>. Respecto a su regulación epigenética, en las células Tregs 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)<sup>[73]</sup>.

##### ***CNS0***

Región recientemente descrita, en la CNS0 se une Satb1, un organizador de cromatina, que actúa como un factor pionero para activar super-enhancers ("potenciadores") en el gen de *Foxp3*, y otros genes como *Ctla4* y *Il2ra*, en estadios iniciales de la diferenciación de las células tTregs<sup>[77, 78]</sup>. La unión Satb1 a la CNS0 induce cambios en la accesibilidad de la cromatina y modificaciones de histonas en *Foxp3*, permitiendo así que otros factores de transcripción se unan y activen los otros elementos reguladores de las CNS que conducen al inicio de la expresión del FOXP3<sup>[77, 78]</sup>. Esta región contiene la modificación de histonas H3K27Ac<sup>[78]</sup>.

### **CNS1**

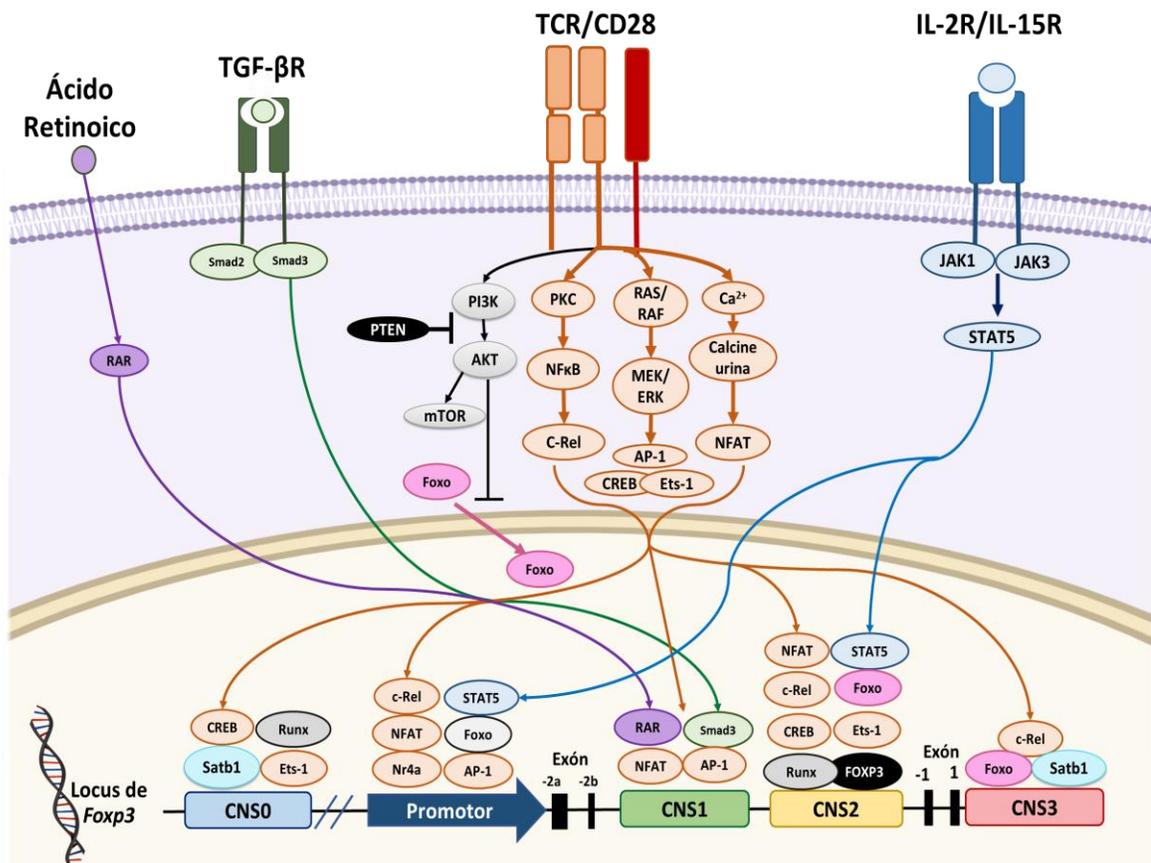
La CNS1 está situado dentro del primer intrón, aproximadamente 2 kb río abajo del promotor y es una región crítica para la inducción del FOXP3 durante la diferenciación de las células iTregs y pTregs, pero no es indispensable para la generación de tTregs<sup>[73, 79]</sup>. La unión de los factores de transcripción 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 activadas por medio de su TCR en presencia de TGF- $\beta$  y de ácido retinoico<sup>[72, 73, 77]</sup>. La CNS1 es regulada a través de modificaciones permisivas de histonas H3Ac, H4Ac, H3K4me3, H3K4me2; estas modificaciones se encuentran más enriquecidas en las células tTregs y en las iTregs, en comparación con las células Tconv<sup>[73]</sup>.

### **CNS2**

La CNS2 (también llamado TSDR, *Treg-specific demethylated region*) es un elemento rico en islas CpG que se encuentra en el primer intrón, aproximadamente 4 kb río abajo del promotor. En células tTregs, 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<sup>[73, 77]</sup>. Consistente con esto, la CNS2 se requiere para el mantenimiento de la expresión de FOXP3 cuando las células Tregs han sido activadas y se encuentran en división celular, especialmente en presencia de citocinas proinflamatorias o cuando la IL-2 es limitada<sup>[80]</sup>. Tras la activación del TCR, la CNS2 interactúa con el promotor de *Foxp3* mediante la vía calcineurina/NFAT; dicha interacción permite que otros factores de transcripción se unan a la CNS2, incluyendo STAT5, y se favorece el mantenimiento de la desmetilación de esta región<sup>[73, 81]</sup>. Diversos estudios han revelado que la TSDR está completamente desmetilado en las células tTregs y las pTregs, pero total o parcialmente metilado en las células Tconv y en las células Tregs generadas *in vitro*, lo cual sugiere que las células iTregs podrían ser más inestables<sup>[73]</sup>. Además de la desmetilación de citosinas, la CNS2 en las células Tregs contiene niveles incrementados de metilación en H3K4 y acetilación de las H3/H4, lo que sugiere que la desmetilación del ADN y las modificaciones permisivas de las histonas generan un estado de cromatina abierta en la CNS2 que promueven la estabilidad de la expresión del FOXP3<sup>[73]</sup>.

## CNS3

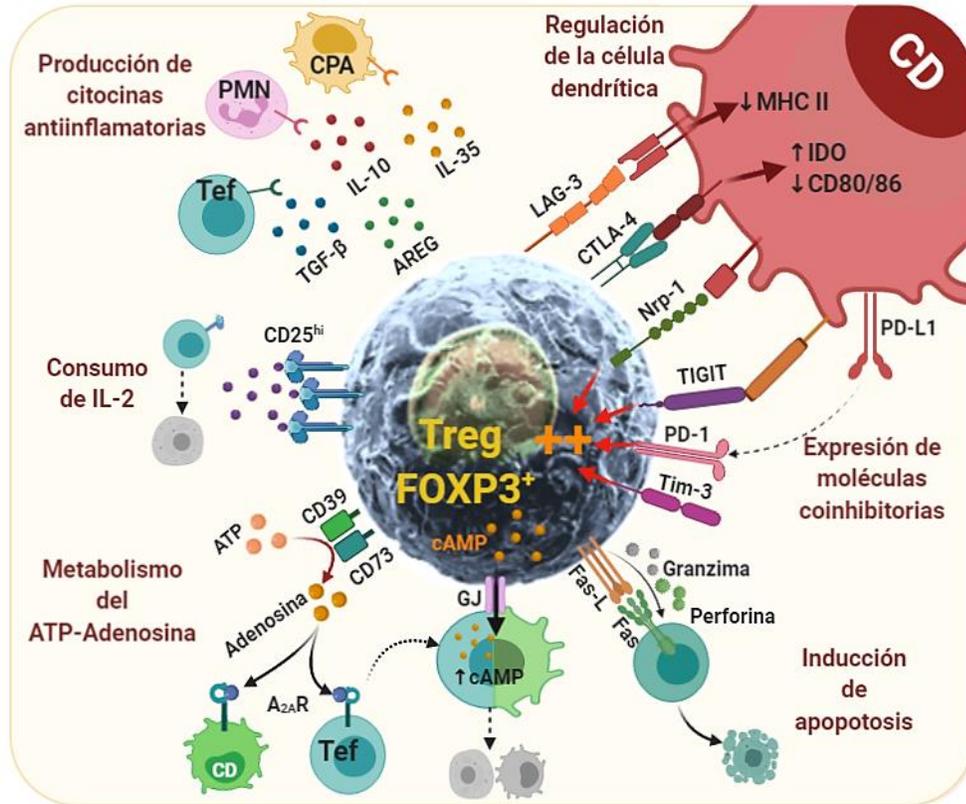
La CNS3 está localizado inmediatamente después del primer exón y aproximadamente a 7 kb río abajo del promotor; también es llamado "elemento pionero", ya que tiene una función fundamental para iniciar la expresión del FOXP3 tanto en las tTregs como pTregs, pero es prescindible una vez que FOXP3 se expresa<sup>[73, 79]</sup>. En la CNS3 se une c-Rel, el cual es requerido para una eficiente inducción del FOXP3<sup>[79]</sup>. Las células Tregs tienen un enriquecimiento de mono- y di-metilación en H3K4, y estas modificaciones permisivas de las histonas ya se encuentran incrementadas subpoblaciones de timocitos, lo que sugiere que la CNS3 facilita la apertura del locus de *Foxp3* en los precursores de las células tTregs<sup>[73, 79]</sup>.



**Figura 7. Regulación transcripcional de la expresión del FOXP3.** Factores de transcripción activados río abajo del TCR y de CD28 (naranja y negro), de los receptores de las citocinas IL-2 (azul) y TGF-β (verde), así como el metabolito ácido retinoico (morado), se unen a la región promotora y a secuencias no codificantes conservadas (CNS0-3) en el locus de *Foxp3* para inducir su expresión. La CNS0, a través de la unión de Satb1, actúa como un elemento pionero requerido para la remodelación de la cromatina y modificaciones de histonas para la activación de los otros elementos CNS, y que conducen al inicio de la expresión de *Foxp3* durante la diferenciación de células tTregs. La CNS1 es esencial para la inducción del FOXP3 en células pTregs y iTregs. La CNS2 (también llamado TSDR) es una región que funciona como un enhancer ("potenciador") para la transcripción de *Foxp3*; además, contiene sitios CpG desmetilados esenciales para la estabilidad de la expresión del FOXP3. La CNS3 también actúa como elemento pionero en el inicio de la transcripción de *Foxp3* y es importante para la generación de células pTregs y tTregs.

### 1.4.3. Mecanismos de supresión de las células Tregs

Después de su activación a través del TCR, las células Tregs llevan a cabo su función supresora mediante mecanismos que incluyen, la producción de citocinas antiinflamatorias, la inducción de apoptosis, la disrupción metabólica y la modulación de las CDs (Figura 8)<sup>[82]</sup>. Estos mecanismos han sido involucrados en la aceptación al trasplante (Tabla 3).



**Figura 8. Mecanismos de supresión ejercidos por las células T reguladoras.** Las células Tregs producen citocinas antiinflamatorias IL-10, IL-35, TGF- $\beta$  y anfiregulina (AREG), las cuales inhiben las funciones de células presentadoras de antígeno (CPA), linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> efectoras (Tef) y polimorfonucleares (PMN). Las células Tregs consumen la IL-2 del microambiente debido a su alta expresión de CD25, lo cual inhibe la proliferación y supervivencia de células Tef. Las ectoenzimas CD39 y CD73 metabolizan el ATP del microambiente y generan adenosina, la cual es reconocida por el receptor A<sub>2A</sub> (A<sub>2A</sub>R) expresados en células Tef y células dendríticas (CD) incrementando la adenosina monofosfato cíclico (cAMP) intracelular que tiene como resultado inhibición de las funciones de células Tef y la maduración de las CDs; además, las Tregs pueden transferir cAMP directamente a células Tconv y CDs a través de proteínas de unión (GJ, gap junctions). Tregs inducen citólisis dependiente de la expresión de Fas-L y la secreción de granzimas/perforinas. La modulación de las CDs incluye: la expresión de LAG-3 que se une a moléculas del MHC II para inhibir la maduración de las CDs y trogocitosis de moléculas del MHC; expresión de CTLA-4 que al unirse a sus ligandos CD80/CD86 induce trans-endocitosis o la producción de IDO, enzima que favorece el catabolismo del triptófano hacia un metabolito tóxico para los linfocitos Tconv; Neuropilina-1 (Nrp-1) favorece interacciones más prolongadas entre Tregs-CDs disminuyendo la activación de células Tef. Receptores coinhibitorios como CTLA-4, Nrp-1, TIGIT, PD-1 y Tim-3 señalizan para favorecer el mantenimiento del fenotipo supresor en las células Tregs.

IL-10 es importante en las células Tregs para mantener la tolerancia al ejercer efectos inmunosupresores en varios tipos de células<sup>[83]</sup>. En las células T, la IL-10 inhibe la proliferación y la producción de citocinas inflamatorias (IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ )<sup>[84-91]</sup>. En las CDs, la IL-10 inhibe la expresión del CD80 y CD86 y moléculas del MHC<sup>[82]</sup>.

Además, la IL-10 producida por las células Tregs juega un papel importante al regular la respuesta inmune de la flora intestinal o antígenos ambientales<sup>[92]</sup>.

TGF- $\beta$  es una citocina primordial para el mantenimiento de la tolerancia, ya que, la deficiencia de TGF- $\beta$  o de su receptor lleva al desarrollo de una enfermedad autoinmune multiorgánica severa mediada por células T<sup>[93, 94]</sup>. Los efectos inmunoreguladores de TGF- $\beta$  sobre las células Tconv incluyen la inhibición de la proliferación celular, la citotoxicidad y la diferenciación de las células Th1 y Th2<sup>[95-97]</sup>. Además, TGF- $\beta$  disminuye la proliferación de los linfocitos B, la citotoxicidad de las células NK, la maduración de las CDs y la activación de células de origen mieloide<sup>[95]</sup>. Interesantemente, las células Tregs pueden tener TGF- $\beta$  unido a membrana, y así ejercer su función supresora de manera dependiente de contacto<sup>[96, 98]</sup>.

IL-35 es principalmente producida por las células Tregs para inhibir las funciones de las células Tconv<sup>[99]</sup>. *In vivo*, las células Tregs deficientes de IL-35 son incapaz de inhibir la proliferación de las células Tconv y de prevenir el desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal<sup>[100]</sup>. Además, IL-35 inhibe la actividad citotóxica de las células T CD8<sup>+</sup>, la diferenciación de las células Th17 y la producción de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IL-23, TNF- $\alpha$ ); simultáneamente, IL-35 incrementa la proliferación de células Tregs y su producción de IL-10<sup>[101-104]</sup>. Asimismo, recientemente se ha demostrado que la IL-35 producida por células Tregs es importante para disminuir el dolor en un modelo encefalomiелitis autoinmune experimental<sup>[105]</sup> y la inflamación durante un proceso alérgico<sup>[106]</sup>. Interesantemente, la IL-35 induce una subpoblación reguladora denominada células iTr35<sup>[99]</sup>, las cuales contribuyen a la tolerancia materno fetal<sup>[107]</sup>.

De manera importante, las células Tregs participan en la reparación del tejido mediante la producción de IL-10, TGF- $\beta$  y anfirregulina (AREG)<sup>[59]</sup>. La AREG, un ligando del receptor del factor de crecimiento epidérmico, producida por las células Tregs participa en la liberación local de TGF- $\beta$  y en la cicatrización del tejido dañado<sup>[108]</sup>. Adicionalmente, en las células Tregs la AREG estimula la secreción de exosomas, a través de los cuales, transfieren micro-ARN (miRNA) inmunosupresores a las células Tconv<sup>[108, 109]</sup>.

Adicionalmente, las células Tregs pueden inhibir las células del sistema inmune mediante inducción de apoptosis. Después de la activación a través del TCR, las células Tregs

producen perforina y granzima y mediante estas moléculas inducen apoptosis en las células Tconv<sup>[110]</sup> y en las células B<sup>[111, 112]</sup>. Además, las células Tregs pueden inducir *in vivo* la muerte programada de células Tconv<sup>[113]</sup> y CDs<sup>[114]</sup> mediante la expresión de FasL.

Las células Tregs tienen la capacidad de causar disrupción metabólica en las células Tconv mediante diferentes mecanismos. Primero, las células Tregs no son capaces de producir IL-2 pero tienen niveles más altos del CD25 (cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2) que las células Tconv, por lo cual, son más eficientes para utilizar la IL-2 del microambiente; mediante este mecanismo pueden disminuir la proliferación y la supervivencia de las células Tconv<sup>[115, 116]</sup>. Las células Tregs también tienen una alta expresión de CD39 y CD73, dos ectoenzimas que hidrolizan el ATP o ADP a AMP y el AMP a adenosina, respectivamente<sup>[82]</sup>. La adenosina generada, a través de la activación del receptor de adenosina 2A (A<sub>2A</sub>R), incrementa la concentración intracelular de adenosina monofosfato cíclica (cAMP), la cual suprime las funciones efectoras de las células Tconv y CDs<sup>[117-120]</sup>. Cabe resaltar que en comparación con las células Tconv, las células Tregs tienen una mayor concentración de cAMP debido a una alta expresión de la adenilato ciclasa, y a través de una comunicación intercelular dependiente de proteínas de unión (GJ, gap junctions), las células Tregs pueden transferir directamente el cAMP a las células Tconv y CDs<sup>[119]</sup>.

Las células Tregs también pueden modular la maduración y/o función de las CDs a través de la expresión de moléculas inmunomoduladoras como CTLA-4, neuropilina-1 y LAG-3. CTLA-4, miembro de la familia del CD28, es una molécula coinhibitoria expresada constitutivamente en las células Tregs humanas y de ratón, cuyos ligandos son CD80/CD86<sup>[82]</sup>. La competencia con CD28 en células T por los ligandos CD80/CD86 expresados sobre las CPAs<sup>[121]</sup> y trans-endocitosis de CD80/CD86<sup>[122]</sup> constituyen los dos principales mecanismos biológicos de supresión mediados por CTLA-4. Neuropilina-1 (Nrp-1), un correceptor de semaforina-4a, promueve interacciones más prolongadas entre las células Tregs y las CDs, y de esta manera disminuyen la probabilidad de que se activen las células Tconv<sup>[123, 124]</sup>. Adicionalmente, la señalización a través de Nrp-1 contribuye a la estabilidad y la actividad supresora de las células Tregs mediante la inhibición de la vía Akt/mTOR. En este sentido, las células Tregs deficientes de Nrp-1 muestran un fenotipo inflamatorio caracterizado por la secreción de IFN- $\gamma$  y menor producción de IL-10<sup>[125, 126]</sup>.

LAG-3 es una molécula altamente homóloga al correceptor CD4 que también se une a moléculas del MHC clase II pero con mucha mayor afinidad<sup>[82]</sup>. La expresión de LAG-3 en las células Tregs interactúa con moléculas del MHC II para inhibir la maduración de las CDs<sup>[127-129]</sup> y para reducir su capacidad presentadora adquiriendo moléculas MHC II a través de trogocitosis<sup>[130]</sup>.

Asimismo, las células Tregs expresan moléculas coinhibitorias como PD-1, Tim-3 y TIGIT, las cuales favorecen el mantenimiento de su fenotipo supresor. La señalización del PD-1, un miembro de la familia del CD28<sup>[131]</sup>, regula la producción de IL-10<sup>[132]</sup> y el mantenimiento de la expresión de FOXP3 en las células Tregs<sup>[133]</sup>. Además, la expresión del PD-1 en células Tregs es importante para que estas puedan suprimir las células B y promover la generación *de novo* de células Tregs<sup>[134]</sup>. La expresión de Tim-3 es incrementada en las células Tregs después de una activación, y las células Tregs Tim-3<sup>+</sup> muestran una mayor expresión de moléculas inhibitorias (CTLA-4, LAG-3 y PD-1) y mayor secreción de citocinas supresoras como IL-10 y TGF- $\beta$ <sup>[135, 136]</sup>. De manera similar, subpoblaciones de células Tregs TIGIT<sup>+</sup> se han descrito que son mejores supresoras en comparación con células Tregs TIGIT<sup>-</sup>, ya que tienen una mayor expresión de genes relacionados a la inmunoregulación (PD-1, CTLA-4, Tim3, LAG-3, FOXP3, CD25, GITR, IL-10)<sup>[137]</sup>. Una característica peculiar de las células Tregs TIGIT<sup>+</sup> es su capacidad de suprimir preferencialmente las respuestas tipo Th1 y Th17, pero no Th2, mediante la secreción de proteína 2 similar a fibrinógeno soluble (Fgl2) e IL-10<sup>[137]</sup>.

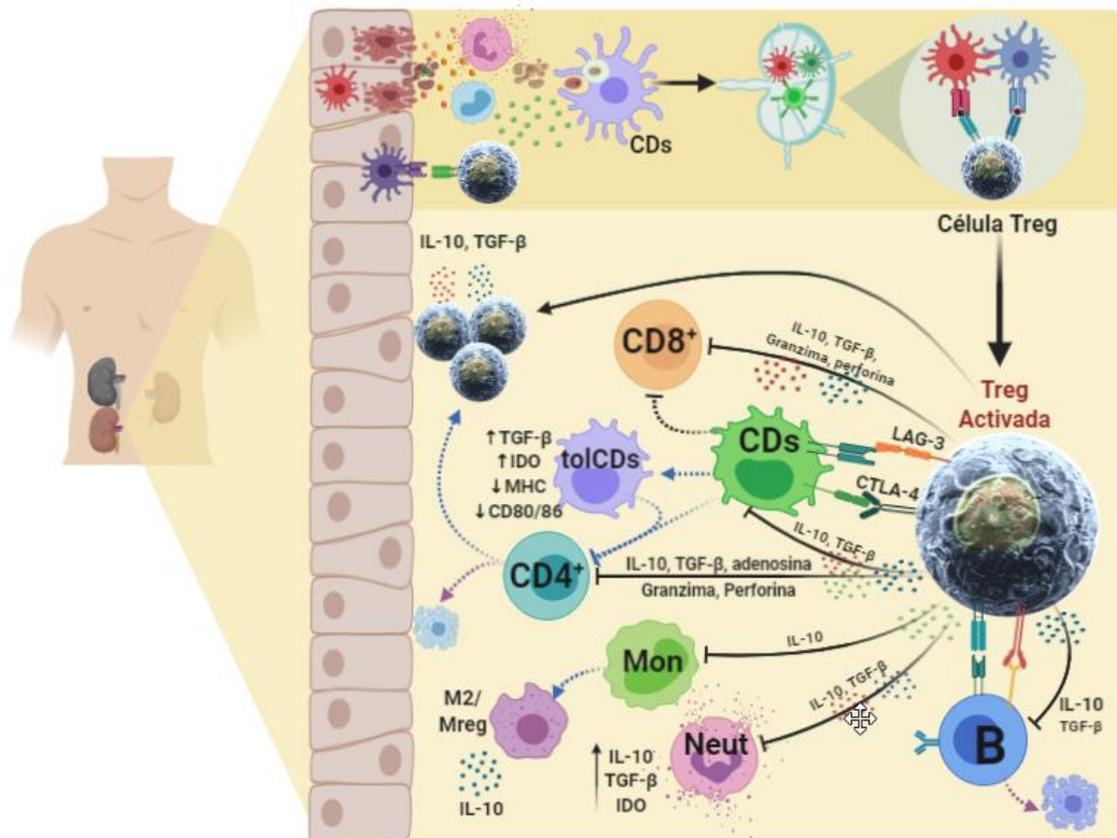
Por último, las células Tregs también tienen la capacidad de inhibir los monocitos y las células polimorfonucleares. Por ejemplo, después del cocultivo con las células Tregs, los monocitos exhiben características clásicas de los macrófagos M2 con una capacidad reducida para producir citocinas inflamatorias (IL-6 y TNF- $\alpha$ ), baja expresión del CD86, aumentada producción de IL-10 y menor capacidad de activar las células Tconv<sup>[138, 139]</sup>. Por otra parte, las células Tregs regulan limitan la acumulación de neutrófilos en tejidos inflamados mediante la disminución de la expresión de quimiocinas (CXCL1 y CXCL2)<sup>[140]</sup>. Además, los neutrófilos cocultivados con células Tregs producen más IL-10 y TGF- $\beta$  junto con una disminución de la producción de IL-6<sup>[141]</sup>.

**Tabla 3 | Participación de los mecanismos de supresión de las células Tregs en la respuesta inmune al trasplante.**

Mecanismo	Evidencia científica
<b>IL-10</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>En modelos de ratón, la IL-10 prolonga la sobrevida de aloinjertos de piel<sup>[84-86]</sup>, pulmón<sup>[87, 88]</sup>, corazón<sup>[89]</sup>, islotes pancreáticos<sup>[90, 142]</sup> y riñón<sup>[91]</sup>, así como inhiben la EICH aguda y crónica<sup>[143]</sup>, al inhibir la proliferación y secreción de citocinas en células T aloespecíficas.</li> </ul>
<b>TGF-β</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Induce la generación <i>de novo</i> de Tregs<sup>[84, 144, 145]</sup> y aumento de la expresión de moléculas coinhibitorias en células Tconv<sup>[146]</sup> durante la respuesta inmune al trasplante. Asimismo, TGF-β inhibe los síntomas de EICH inhibiendo las funciones de las células Tconv<sup>[95]</sup>.</li> </ul>
<b>IL-35</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>En modelos de ratón, IL-35 favorece la sobrevida del aloinjerto cardiaco<sup>[101]</sup> e islotes pancreáticos<sup>[102]</sup>, así como inhibe la severidad de la EICH<sup>[103, 104]</sup>.</li> </ul>
<b>AREG</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>La administración de AREG estimula la regeneración hepática después de un trasplante parcial de hígado<sup>[147]</sup>.</li> </ul>
<b>Granzima</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fundamental para el mantenimiento de la tolerancia a largo plazo mediada por las células Tregs<sup>[148]</sup> y es necesaria para controlar la EICH gastrointestinal<sup>[149]</sup>.</li> </ul>
<b>CD39-CD73</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Este eje prolongan la sobrevida de injertos piel<sup>[150]</sup>, islotes pancreáticos<sup>[151]</sup>, corazón<sup>[152, 153]</sup>, tráquea<sup>[154]</sup> e hígado<sup>[155]</sup>, disminuyendo la infiltración leucocitaria (linfocitos T, PMNs, macrófagos), la producción de citocinas inflamatorias y proliferación de las células Tconv.</li> </ul>
<b>CTLA-4</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>En modelos de ratón, el bloqueo<sup>[156-160]</sup> o deficiencia<sup>[161, 162]</sup> de CTLA-4 acelera el rechazo de aloinjertos debido a un incremento de la activación y proliferación de las células Tconv.</li> <li>En estudios preclínicos en ratón, la administración de CTLA4-Ig prolonga la supervivencia del injerto de islotes pancreáticos<sup>[161]</sup>, corazón<sup>[156-160, 163-166]</sup> y piel<sup>[167]</sup>.</li> </ul>
<b>Nrp-1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Las células Tregs Nrp-1<sup>+</sup> promueven la aceptación del aloinjerto de piel a largo plazo regulando la producción de IFN-γ e IL-17A en las células Tconv CD4<sup>+</sup><sup>[168, 169]</sup>.</li> </ul>
<b>LAG-3</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>El aumento de la expresión de LAG-3 en células Tregs prolongan la sobrevida de aloinjertos de islotes pancreáticos modulando la producción de IL-21 e IL-17<sup>[170]</sup>.</li> <li>En células Tconv CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, LAG-3 es esencial para inhibir su activación, proliferación y producción de citocinas inflamatorias durante la EICH<sup>[130, 171]</sup>.</li> </ul>
<b>PD-1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>La deficiencia<sup>[172-177]</sup> o bloqueo<sup>[146, 172, 176-180]</sup> de PD-1 lleva a un rechazo acelerado del aloinjerto. PD-1 expresado en células Tconv CD8<sup>+</sup> aloespecíficas inhibe su activación, proliferación, sobrevida, producción de citocinas y su diferenciación a células Tm<sup>[172, 173, 175-177, 180]</sup>, así como induce anergia de células T CD8<sup>+</sup><sup>[146]</sup>.</li> </ul>
<b>Tim-3</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>En modelo de trasplante de piel, las células Tregs Tim-3<sup>+</sup> infiltran el aloinjerto<sup>[135]</sup>, mientras el bloqueo de Tim-3 acelera el rechazo del aloinjerto<sup>[181]</sup>. Pero, la transferencia adoptiva las Tregs Tim-3<sup>+</sup> fueron inferiores en prolongar la supervivencia del injerto en comparación Tregs Tim-3<sup>-</sup>, ya que eran más propensas a apoptosis<sup>[135]</sup>.</li> </ul>
<b>TIGIT</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>En un modelo de EICH aguda alogénica, el tratamiento con TIGIT-Fc retrasó los síntomas y la mortalidad, incluso después del inicio de la EICH, mediante la inhibición de la infiltración de células T CD8<sup>+</sup>Granzima-B<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup> en el del hígado e intestino delgado<sup>[182]</sup>.</li> </ul>

### 1.5. Células Tregs en la inducción de tolerancia al trasplante

Actualmente es ampliamente aceptado que las células Tregs juegan un rol esencial en la tolerancia al trasplante de órganos sólidos mediante diversos mecanismos (Figura 9). Se ha demostrado que las células Tregs suprimen la activación y función de las células Tconv efectoras, células B y células del sistema innato, lo que da como resultado tolerancia al aloinjerto en varios estudios con modelos animales incluyendo de riñón<sup>[183, 184]</sup>, piel<sup>[185, 186]</sup>, corazón<sup>[186]</sup> e islotes pancreáticos<sup>[187, 188]</sup>, así como previenen el desarrollo de la EICH<sup>[189, 190]</sup>. Asimismo, se han descrito células Tregs funcionales que infiltran distintos aloinjertos (ej. piel, corazón y riñón), cuando se transfieren adoptivamente pueden conferir tolerancia a un ratón que recibe por primera vez un trasplante<sup>[191]</sup>.



**Figura 9. Participación de células Tregs en la inducción de tolerancia al trasplante.** Las células Tregs pueden reconocer aloantígenos presentados mediante vía directa o indirecta y de esta manera ser activadas. Una vez activadas, las células Tregs pueden migrar al aloinjerto donde tienen la capacidad de suprimir las funciones efectoras de una amplia de células del sistema inmune que han sido implicadas en el rechazo al aloinjerto incluyendo células T convencionales ( $CD4^+$  y  $CD8^+$ ), células dendríticas (CDs), monocitos (Mon), neutrófilos (Neut) y células B. Los mecanismos de supresión incluyen producción de citocinas antiinflamatorias (IL-10, TGF- $\beta$ ), inducción de apoptosis (granzimas, perforinas) y por expresión de moléculas coinhibitorias (CTLA-4, LAG-3). Además, pueden amplificar la regulación de la respuesta inmune mediante la inducción de células con características inmunorreguladoras como CDs tolerogénicas (tolCDs), macrófagos reguladores (Mregs) o tipo M2, y células Tregs inducidas. Finalmente, las células Tregs podrían participar en la reparación y regeneración del tejido dañado mediante la producción de TGF- $\beta$  e IL-10.

Uno de los primeros estudios que describieron la contribución de las células Tregs en la aceptación del trasplante fue realizado hace 25 años por Sakaguchi *et al.*<sup>[192]</sup>, quienes demostraron que la transferencia adoptiva de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en ratones impedían el rechazo de injertos de piel alogénicos. Los modelos de ratón en los que las células Tregs pueden ser eliminadas de manera específica y sistémica<sup>[183, 184]</sup>, han evidenciado definitivamente el papel de las células Tregs FOXP3<sup>+</sup> en la inducción de tolerancia al trasplante de riñón. En estos modelos, la eliminación de las células Tregs resulta en un rechazo acelerado del injerto caracterizado por una severa inflamación distinguida por una gran infiltración de células T, neutrófilos y monocitos, acompañado de un incremento significativo en suero de citocinas inflamatorias (IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) y creatinina<sup>[183, 184]</sup>. Además, en los ratones tolerantes las células Tregs se expanden y se establecen por un largo periodo en el injerto y en ganglios linfáticos drenantes y, también, muestran características de células Tregs efectoras con una mayor expresión de TGF- $\beta$  e IL-10, Blimp-1 y CXCR3<sup>[183]</sup>. Interesantemente, las células Tregs que inducen tolerancia se concentran dentro del riñón trasplantado en estructuras linfoides organizadas y ricas en CDs CD11c<sup>+</sup> inmaduras caracterizadas por la baja expresión de moléculas coestimuladoras<sup>[184]</sup>. Además, las células T FOXP3<sup>+</sup> infiltrantes son capaces de transferir la tolerancia dominante de manera aloantígeno-específica<sup>[183]</sup>. Curiosamente, ratones tolerantes a aloinjertos renales también desarrollan una tolerancia sistémica a aloinjertos de piel y corazón de la misma cepa donante. Este fenómeno también se ha demostrado en cerdos<sup>[193, 194]</sup>, primates no humanos<sup>[195]</sup>, y hasta cierto punto en humanos<sup>[196-198]</sup>, lo que sugiere que los mecanismos tolerogénicos naturales del riñón en ratón serían similares en humanos.

Estudios realizados en humanos también apoyan el rol de las células Tregs en la aceptación al aloinjerto. Pacientes con trasplante de hígado<sup>[199-201]</sup> o de riñón<sup>[202, 203]</sup> que desarrollaron tolerancia clínica operacional exhiben un número significativamente mayor de células T FOXP3<sup>+</sup> en sangre o en biopsias, en comparación con receptores estables no tolerantes o con rechazo activo. Cabe resaltar, las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD45RA<sup>-</sup> (Tregs de memoria) de receptores renales con tolerancia operacional presentan una mayor capacidad de suprimir *in vitro* la proliferación de las células Tconv CD4<sup>+</sup> en comparación con las células Tregs provenientes de receptores no tolerantes, lo cual se correlaciona con un incremento de la hipometilación de citosinas en el locus de *Foxp3*<sup>[202]</sup>. Adicionalmente, la disminución tanto

de la función supresora *in vitro*<sup>[204]</sup>, como, de la proporción de células Tregs en sangre<sup>[205]</sup>, previo al trasplante, han sido utilizadas como biomarcadores para predecir el retraso de la función del injerto renal y incremento de episodios de rechazo agudo<sup>[206]</sup>. Acorde a esto, el incremento de células T CD25<sup>hi</sup> FOXP3<sup>+</sup> en sangre o en biopsias de pacientes con trasplante de riñón se correlaciona con una mayor función renal<sup>[207-210]</sup> y mejor pronóstico de aceptación del injerto a largo plazo<sup>[208, 209, 211-214]</sup>. Asimismo, el aumento de las células Tregs FOXP3<sup>+</sup> también ha sido utilizado como biomarcador para el pronóstico de aceptación de corazón<sup>[215]</sup>, hígado<sup>[216]</sup> y pulmón<sup>[194]</sup>. Por lo tanto, dilucidar los mecanismos celulares y moleculares (Figura 9), por los cuales las células Tregs inducen tolerancia a un aloinjerto en ratón y en humanos puede revelar posibles nuevos regímenes aplicables clínicamente.

### **1.6. Inmunoterapia con células Tregs en trasplante y sus retos**

La inmunoterapia con células Tregs 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 el sistema inmune del receptor al reintroducirlas. Tercero, la terapia con células T FOXP3<sup>+</sup> puede establecer la tolerancia inmunológica y tener efectos terapéuticos a largo plazo, como ha sido demostrado en estudios preclínicos. A pesar del potencial terapéutico que tendrían las células Tregs, la aplicación clínica en humanos ha tenido varios retos los cuales se describen a continuación.

#### ***1.6.1 Aislamiento y expansión ex vivo***

Además de la expresión del CD25 y FOXP3, las células Tregs humanas también expresan CD27, CD45RA, CD39, CD122, CTLA-4 (CD152) y GITR, entre otros<sup>[58]</sup>. Sin embargo, la mayoría de estos marcadores de superficie celular no son exclusivos de las células Tregs 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 células Tregs. A pesar de esto, las células Tconv CD4<sup>+</sup> al activarse pueden expresar FOXP3 de manera temporal, sin adquirir un fenotipo regulador<sup>[217]</sup>. Además, al ser una proteína intracelular, este marcador no se puede utilizar para aislar las células Tregs. Por lo tanto, es necesario encontrar marcadores de superficie que definan poblaciones Tregs "puras" para terapia celular. En este aspecto, distintas combinaciones de marcadores han sido

propuestas para el aislamiento de las células Tregs con fines terapéuticos. Por ejemplo, el aislamiento de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> permite obtener Tregs con alta pureza, ya que existe una inversa correlación entre la expresión del CD127 y del FOXP3<sup>[218]</sup>, incluso esta población celular tienen una mayor capacidad para inducir tolerancia al aloinjerto en comparación con aislamiento basado solo en la expresión del CD25<sup>[219]</sup>.

Un obstáculo importante en la aplicación clínica de células Treg es su número limitado en sangre, que no excede el 5-10% del total de las células T CD4<sup>+</sup> (25000-50000 Tregs/mL sangre), por consiguiente, es necesario expandir las células Tregs para obtener los números necesarios para su aplicación clínica (ver adelante sección 1.6.3). Las células Tregs son relativamente anérgicas en respuesta a la estimulación de su TCR *in vitro*, pero pueden ser activadas para proliferar mediante la combinación de una estimulación policlonal con anti-CD3/anti-CD28 y altas concentraciones de IL-2 y/o con IL-15<sup>[220-222]</sup>. *In vivo*, diversos ensayos preclínicos han demostrado que las células Tregs expandidas policlonalmente son funcionalmente eficaces para prevenir el rechazo de aloinjertos de piel<sup>[223]</sup>, córnea<sup>[224]</sup>, corazón<sup>[225, 226]</sup>, y el desarrollo de EICH<sup>[227-230]</sup>, aún en ausencia de inmunosupresión. Asimismo, las células Tregs humanas expandidas policlonalmente prolongan indefinidamente la supervivencia de aloinjertos de piel<sup>[231]</sup> e islotes pancreáticos <sup>[142, 232]</sup> en modelos de ratón humanizados.

### ***1.6.2. Especificidad***

En los modelos preclínicos, la terapia con células Tregs tiene una característica muy interesante: las células Tregs purificadas de receptores tolerantes son más eficaces para transferir la tolerancia a nuevos hospederos de aloinjertos, en comparación con las células Tregs aisladas de individuos sin un previo trasplante<sup>[183, 191, 221]</sup>. Esto puede deberse al incremento de la frecuencia de las células Tregs específicas a aloantígenos del donador (aloespecíficas). En consecuencia, un elemento importante a considerar a la hora de diseñar las estrategias de inmunoterapia es el uso de las células Tregs antígeno-específicas.

La mayoría de los protocolos publicados de expansión *ex vivo* de las células Tregs con fines terapéuticos, se basan en la estimulación con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 para obtener células Tregs con un amplio repertorio (policlonales)<sup>[220, 222]</sup>. Otro enfoque que se ha planteado es aislar y expandir células Tregs con una especificidad de antígeno dada, en un

contexto de trasplante, capaces de reconocer aloantígenos. En este aspecto, diversos estudios preclínicos han resaltado la capacidad de las células Tregs aloespecíficas expandidas *ex vivo* y transferidas para inducir la aceptación a largo plazo de injertos de piel<sup>[233-242]</sup>, corazón<sup>[238, 243-246]</sup>, islotes pancreáticos<sup>[247]</sup>, hígado<sup>[248]</sup> y córnea<sup>[249]</sup>, al igual que pueden retrasar el desarrollo de la EICH<sup>[238, 250, 251]</sup>, ya sean activadas mediante vía de alorreconocimiento directa<sup>[233, 235, 237, 239, 241, 244-251]</sup> o indirecta<sup>[234, 236, 238-240, 242, 243]</sup>. De hecho, se ha demostrado que las células Tregs aloespecíficas tienen una superioridad para prolongar la supervivencia del injerto en comparación con las células Tregs policlonales<sup>[236, 245-247, 252, 253]</sup>.

Dos estudios compararon la eficacia de células Tregs activadas por la vía directa e indirecta en ratones<sup>[238, 239]</sup>. Lo primero que destacan estos estudios es la capacidad de las células Tregs con aloespecificidad directa para prevenir el rechazo agudo. En cambio, las células Tregs con especificidad indirecta fueron más eficaces para prevenir el rechazo agudo y crónico, y en consecuencia inducir aceptación del órgano injertado a largo plazo<sup>[238, 239]</sup>. No obstante, otras investigaciones han demostrado que la transferencia adoptiva de células Tregs con aloespecificidad directa a dosis más altas son capaces de inducir tolerancia al aloinjerto<sup>[233, 241, 244, 247]</sup>. En la literatura, el aislamiento y expansión de células Tregs con aloespecificidad directa ha sido el enfoque de expansión preferente debido, posiblemente, a la alta frecuencia precursora que existen de estas células en individuos<sup>[254]</sup>. Por el contrario, la expansión de células Tregs con especificidad indirecta ha demostrado ser más desafiante debido a la baja frecuencia de estas células naturalmente presentes en la periferia antes de un procedimiento de trasplante<sup>[254, 255]</sup>. Una alternativa que puede adoptarse para obtener células Tregs específicas de antígeno es conferir su especificidad mediante modificación genética. De hecho, el concepto de usar células Tregs que expresan TCRs antígeno-específicos obtenidas por ingeniería genética ha sido investigado en el contexto de trasplante<sup>[236, 237, 239, 242, 243, 252, 253]</sup>, y estos trabajos ponen en manifiesto el potencial clínico de la terapia genética celular. Un trabajo realizado en ratones resalta el hecho que solo las células Tregs con doble especificidad protegieron a aloinjertos cardíacos del rechazo crónico<sup>[239]</sup>. Tomados en conjunto, se ha propuesto que la combinación de células Tregs aloespecíficas directas e indirectas puede ser un enfoque óptimo en la inducción de tolerancia al injerto cuando el número de células Tregs es limitante<sup>[221]</sup>.

### **1.6.3. Dosis**

El objetivo para la inducción de tolerancia es inclinar la balanza a favor de la inmunorregulación, basados en el aumento *in vivo* de los números de las células Tregs sobre las Tconv. Los datos extrapolados de los modelos en animales, en los cuales se han transferido células Tregs junto con células Tconv para determinar las relaciones que promueven tolerancia, han sugerido proporciones entre 1:2 a 5:1 de Tregs:Tconv [225, 227-230, 233-237, 240, 242, 244, 250-253, 256]. Aunque son limitados los estudios para establecer la dosis óptima de células Tregs para su uso en ensayos clínicos, se ha postulado que, en ausencia de terapia de inducción inmunosupresora, se necesitará administrar de  $49-79 \times 10^9$  de células Tregs policlonales para aumentar la población de Tregs a números clínicamente eficaces para la aceptación del trasplante [221, 222, 256]. Por el contrario, en conjunto con terapias de inducción con inmunosupresores que generen una reducción de linfocitos T (como la timoglobulina o el alemtuzumab), se ha sugerido que una dosis única de  $3-5 \times 10^9$  de células Tregs policlonales sería suficiente para aumentar la proporción de Tregs a niveles clínicamente eficaces. En cambio, usando terapias antígeno-específicas, se ha sugerido que sólo se requerirían de una décima a una centésima parte de estos números empleando Tregs aloespecíficas para lograr la misma eficacia que las Tregs policlonales [221, 222, 256]. Sin embargo, es importante tener en cuenta que estas extrapolaciones se han realizado a partir de modelos en ratones. Con el inicio de ensayos clínicos en humanos que demuestran la seguridad de la terapia con distintas dosis de Tregs, se espera poder determinar en un futuro próximo la dosis de Tregs clínicamente eficaz.

### **1.6.4. Estabilidad**

Un estudio realizado por Hoffmann *et al.* [257], reportó que la estimulación *in vitro* repetitiva del TCR en células Tregs CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>-</sup> a largo plazo (mayor a tres semanas de expansión) causa la pérdida de la expresión del FOXP3, lo cual correlacionó con una hipermetilación de citosinas en el locus de *Foxp3*. Existe suficiente evidencia que las células Tregs son plásticas y tienen el potencial de convertirse en células inflamatorias bajo ciertas condiciones [76]. En este contexto, distintos estudios han demostrado que las células Tregs pueden disminuir la expresión de FOXP3 cuando son activadas *in vitro* en presencia de citocinas inflamatorias (IL-6, IL-1, IL-23, TNF- $\alpha$ ) [258-260], o *in vivo* bajo condiciones linfopénicas u otras patologías inflamatorias [76], lo que se ha correlacionado con el estatus epigenético en las células Tregs. Específicamente, la TSDR desmetilada es requerido para el mantenimiento de la expresión de FOXP3 cuando las células Tregs se encuentran en proliferación, especialmente en

presencia de citocinas proinflamatorias o cuando la IL-2 es limitada<sup>[80]</sup>. Por lo tanto, estudios en Tregs con fines de aplicación clínica, requerirán una mayor comprensión de los factores que causan inestabilidad en las células Tregs para diseñar estrategias que permitan estabilizar la expresión del FOXP3 y, por lo tanto, su función supresora, durante la estimulación *ex vivo*. En este sentido, existen estudios *in vitro* que han demostrado que la adición de rapamicina, un fármaco inhibidor de la vía PI3K/Akt/mTOR, inhibe la proliferación de las células Tconv y confiere una ventaja selectiva para la proliferación de las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FOXP3<sup>+</sup><sup>[261, 262]</sup>. Además, la rapamicina incrementa la función reguladora y la expresión del FOXP3<sup>[263-266]</sup>. Otros estudios *in vitro* han demostrado que la adición de ácido retinoico<sup>[267]</sup> o de oligodeoxinucleótidos CpG<sup>[268]</sup> durante la expansión *ex vivo* de células Tregs CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> mantienen una completa hipometilación de la TSDR-*Foxp3* y por consecuencia estabilizan la expresión del FOXP3.

#### ***1.6.5. Efecto de los fármacos inmunosupresores sobre las células Tregs***

La preservación de la función de las células Tregs *in vivo* será clave para lograr con éxito la supervivencia del injerto a largo plazo sin causar episodios de rechazo, especialmente porque la principal meta es sustituir parcial o completamente los niveles de inmunosupresión generalizada para minimizar sus efectos secundarios. Por lo tanto, en el diseño de inmunoterapias basadas en la transferencia de células Tregs se debe tomar en cuenta el efecto de los fármacos inmunosupresores sobre la homeostasis de las Tregs<sup>[269-271]</sup> (tabla 5).

Dado que distintas señales a través del TCR, CD28 o receptores de citocinas controlan la generación, mantenimiento y función de las células Tregs, los fármacos inmunosupresores tendrían diferentes mecanismos de acción sobre la homeostasis de las células Tregs. Por ejemplo, la activación excesiva de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR conduce a la desestabilización de la expresión del FOXP3 y la función de las células Tregs<sup>[68-70]</sup>. Por lo tanto, los inhibidores de mTOR (rapamicina o everolimus) favorecen el incremento de las células Tregs tanto *in vitro*<sup>[261, 262]</sup> como *in vivo*<sup>[261-266, 270]</sup>. Por el contrario, los iCN bloquean la translocación nuclear de NFAT y así afectan a las células Tregs directa o indirectamente<sup>[64]</sup>. La unión de NFAT a CNS1 es importante para la inducción células pTregs y su unión a CNS2 es crítica para la estabilidad de células Tregs<sup>[73, 77, 81, 270]</sup>. Además, los iCN afectan indirectamente, al limitar la producción de IL-2 por células Tconv, dado que la IL-2 es indispensable para el desarrollo de células Tregs, su homeostasis y su función<sup>[64, 115, 116, 270]</sup>. Mientras que, las señales coestimuladoras a través del CD28 tienen un papel esencial en la

diferenciación de las células tTregs y expresión del FOXP3<sup>[64-67]</sup>. En este aspecto, recientemente nuestro grupo reportó que receptores renales tratados con BLT a largo plazo (6 a 8 años) tienen una disminución significativa de la proporción de células Tregs en sangre en comparación con individuos sanos<sup>[272]</sup>. Además, las células Tregs de estos pacientes tenían un aumento de la metilación de la TSDR de *Foxp3*, lo cual se asoció con disminución de su expresión del FOXP3 y de su capacidad supresora *in vitro*<sup>[272]</sup>.

**Tabla 5 | Efecto de los inmunosupresores sobre la homeostasis de las células Tregs.**

Fármaco	Datos
<b>EFECTO POSITIVO</b>	
<b>Timoglobulina</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i>, induce la expresión del FOXP3 y la producción de citocinas antiinflamatorias en células T CD4<sup>+</sup> <sup>[270, 273-275]</sup>.</li> <li>• <i>In vivo</i>, reduce el número absoluto de células Tregs, pero en menor grado comparado con las células Tconv, y además las Tregs se recuperan más rápido durante la reconstitución inmune incrementando la relación Tregs/Tconv <sup>[269-271, 276]</sup>.</li> </ul>
<b>Alemtuzumab</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vivo</i>, reduce preferentemente los números de células Tconv sobre Tregs, lo que resulta en un aumento de la relación Tregs/Tconv<sup>[270, 277, 278]</sup>.</li> <li>• <i>In vitro</i>, induce la conversión de células T vírgenes a Tregs, aumenta la producción de citocinas antiinflamatorias (IL-10, TGF-β), y suprime la secreción de citocinas proinflamatorias (IFN-γ, IL-17)<sup>[270, 271]</sup>.</li> </ul>
<b>Micofenolato</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i>, no afecta el fenotipo supresor de las células Tregs e inhibe la diferenciación de células Th17<sup>[270, 279]</sup>.</li> <li>• <i>In vivo</i>, datos preclínicos y clínicos revelan un incremento de células Tregs en individuos tratados con micofenolato<sup>[270, 271, 280, 281]</sup>.</li> </ul>
<b>Inhibidores mTOR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i>, rapamicina favorece la proliferación selectiva de células Tregs sobre las Tconv, e incrementa su función y expresión de FOXP3<sup>[261-266, 270]</sup>.</li> <li>• Pacientes tratados con rapamicina (sirolimus) o everolimus muestran incremento de los números y proporción de células Tregs en sangre<sup>[269-271, 282-287]</sup>.</li> </ul>
<b>Corticoesteroides</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incrementa el porcentaje de células Tregs en comparación con otras Tconv en pacientes<sup>[279]</sup>.</li> <li>• Favorece la generación <i>de novo</i> de células Tregs en presencia de TGF-β, e inhibiendo la producción de citocinas inflamatorias <sup>[279]</sup>.</li> </ul>
<b>EFECTO NEGATIVO</b>	
<b>Anti-CD25</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disminuye transitoriamente los números de células Tregs en sangre e inhibe su expresión del CD25<sup>[279, 288, 289]</sup>.</li> </ul>
<b>Inhibidores de calcineurina</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dosis terapéuticas altas o un tratamiento prolongado de iCN disminuye la frecuencia y números totales de células Tregs en sangre, así como su función supresora <i>in vitro</i><sup>[269-272, 281, 286, 287, 290]</sup>.</li> </ul>
<b>Bloqueadores de la coestimulación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disminuyen la proporción y función <i>in vitro</i> de las células Tregs en pacientes con trasplante renal tratados a largo plazo con belatacept (CTLA-Ig)<sup>[272]</sup>.</li> </ul>

### 1.7. Primeros ensayos clínicos con células Tregs en humanos

Después del 2009 en que se realizó la primera infusión de células Tregs en pacientes con EICH, varios ensayos clínicos de fase I o I/II han sido iniciado o completado<sup>[220, 222]</sup>. Los objetivos principales de tales ensayos han sido evaluar la seguridad, la viabilidad y la eficacia de la infusión de las células Tregs en el contexto del trasplante de órganos sólidos, enfermedad de injerto contra huésped (EICH) y autoinmunidad<sup>[220, 222]</sup>.

En el contexto del trasplante, un primer enfoque de la terapia con células Tregs ha sido para el tratamiento de pacientes con EICH activa (Tabla 5). En el primero de estos ensayos, células Tregs policlonales expandidas *ex vivo* fueron usadas para tratar dos pacientes: un paciente afectado con EICH crónica mejoró después de la terapia con células Tregs reduciéndole las dosis de inmunosupresores; el segundo paciente presentaba EICH aguda, pero sólo tuvo una mejora temporal después de la infusión de Tregs<sup>[291]</sup>. En un segundo estudio dirigido por Theil *et al.*<sup>[292]</sup>, trataron cinco pacientes con EICH crónica con células Tregs expandidas, sin embargo, sólo dos pacientes tuvieron un respuesta parcial. Por lo tanto, si bien la terapia parece prometedora, se necesitan ensayos clínicos más grandes para evaluar la eficacia de la terapia adoptiva de células Tregs para revertir los síntomas de la EICH activa.

Un segundo enfoque abordado ha sido transferir células Tregs durante el periodo perioperatorio del trasplante para prevenir el desarrollo de EICH. Un primer grupo de ensayos clínicos utilizaron sangre del cordón umbilical para aislar, expandir e infundir células Tregs policlonales a diferentes intervalos en pacientes que recibieron un trasplante de células troncales hematopoyéticas (TCTH) alogénico<sup>[293, 294]</sup>. La infusión de células Tregs no solo previno las manifestaciones de EICH, sino que tampoco se observó un mayor riesgo de infección oportunista u otros efectos adversos<sup>[293, 294]</sup>. En un segundo grupo de estudios se ha evaluado el impacto de la transferencia de células Tregs no expandidas en pacientes con (TCTH)<sup>[295-297]</sup>. La administración de células Tregs redujo las tasas de EICH aguda y crónica, las infecciones oportunistas y la incidencia acumulada de mortalidad sin recaída<sup>[295-297]</sup>, aún en ausencia de inmunosupresión<sup>[295, 296]</sup>. En conjunto, estos estudios apoyan el potencial terapéutico de las células Tregs policlonales para prevenir el desarrollo de EICH.

**Tabla 5 | Terapia adoptiva de células Tregs en humanos para prevenir o tratar la EICH.**

Trasplante (# de pacientes)	Tregs Infundidas	Pureza	Dosis (Tregs/kg de peso)	No. de dosis (tiempo PT)	Terapia de Mantenimiento	Resultados clínicamente relevantes	Ref.
EICH crónica (P1) EICH aguda (P2)	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> CD127 <sup>-</sup> SP del donador expandidas policlonalmente	40-90% FOXP3 <sup>+</sup>	10 <sup>5</sup> (P1) 3×10 <sup>6</sup> (P2)	1 (3er año) (P1) 3 (+75d, +82d y +92d) (P2)	Prednisona, MMF, Tracolimus	P1: retiro de MMF, insulina y broncodilatadores; ↓ dosis de prednisona; ↑ % Tregs (2 al 5%) después de 6 meses después de la infusión; ↑hemoglobina; ↓ IL-6, IL-10, IL-7, CCL21 en sangre. P2: mejoría clínica temporal.	[291]
EICH crónica refractaria (n= 5)	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> de SP del donador expandidas policlonalmente	77-92 % FOXP3 <sup>+</sup>	0.5-4.5×10 <sup>6</sup>	1 o 2 (+28 a +51 meses)	Prednisolona, Everolimus, Imatinib	En 21 meses PT: dos pacientes tuvieron una respuesta parcial entre la semana tres y cinco; los tres pacientes restantes con enfermedad estable.	[292]
SCU (n=23)	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> de SCU expandidas policlonalmente	31-96 % FOXP3 <sup>+</sup>	0.1-3×10 <sup>6</sup>	2 (+1d y +15d)	CsA, MMF; Rapamicina, MMF	En 12 meses PT: ↓incidencia EICH aguda y crónica; sin toxicidad relacionada a la infusión; ↓ infecciones oportunistas (virales y fúngicas), recaídas y mortalidad temprana; sin afectar reconstitución inmunológica; 18 pacientes sobrevivieron.	[293]
SCU (n= 11)	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> de SCU expandidas policlonalmente	78-95 % FOXP3 <sup>+</sup>	3-100 ×10 <sup>6</sup>	1 (+1d)	Rapamicina, MMF	En 12 meses PT: ↓ EICH aguda, sin toxicidad relacionada a infusión; similar recuperación hematopoyética, infecciones, mortalidad, recaída y supervivencia libre de enfermedad, respecto al grupo control. 8 pacientes sobrevivieron.	[294]
CD34 <sup>+</sup> de SP (n= 43)	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> de SP del donador	65-96 % FOXP3 <sup>+</sup>	1.5 -2.5 × 10 <sup>6</sup>	1 (-4d)	No se realizó	En 46 meses PT: ↓ incidencia EICH aguda y crónica; sin afectar la reconstitución inmunológica; ↓ menor % de infecciones oportunistas y recaída; 29 pacientes sobrevivieron.	[295, 296]
CD34 <sup>+</sup> de SP (n= 12)	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> CD127 <sup>-</sup> de SP del donador	91 – 96 % FOXP3 <sup>+</sup>	1-3 × 10 <sup>6</sup>	1 (0d)	Tracolimus o Rapamicina	En 25 meses PT: sin toxicidad relacionada a la infusión, 5 pacientes desarrollaron EICH aguda y 2 EICH crónica; todos pacientes tuvieron reconstitución inmunológica; 8 pacientes sobrevivieron.	[297]

EICH, Enfermedad injerto contra huésped; SCU, Sangre de cordón umbilical; SP, sangre periférica; ↓, disminución; ↑ incremento; CsA, ciclosporina A; MMF, micofenolato de mofetilo; Ref., Referencia; PT, post-trasplante.

Hasta la noviembre del 2020, sólo se han publicado cinco ensayos clínicos basado en la infusión de células Tregs en el contexto de trasplante de órganos sólidos (Tabla 6). En el primer ensayo publicado en el 2016, siete pacientes con trasplante de hígado de donante vivo recibieron una infusión de un producto celular enriquecido en linfocitos T anérgicos con características inmunorreguladores, el cual no generó un incremento de episodios de rechazo o eventos adversos y, además, los pacientes toleraron con éxito el retiro total de la terapia inmunosupresora comenzado a los 6 meses y se completó a los 18<sup>[298]</sup>. Un estudio de seguimiento a los cinco años después del trasplante, los pacientes tenía una función normal del injerto y se mantenían sin inmunosupresión<sup>[299]</sup>. En un segundo ensayo fase 1 divulgado en el 2017, tres receptores de trasplante renal bajo tratamiento inmunosupresor que presentaban inflamación subclínica del injerto, recibieron una infusión de células Tregs policlonales autólogas seis meses después del trasplante: el producto celular fue bien tolerado y, después de un año de la infusión, los pacientes tenían una función renal normal y se mantenían bajo inmunosupresión<sup>[300]</sup>. En el 2018, se publicó un ensayo fase 1 en el cual nueve receptores renales recibieron una dosis única de células Tregs policlonales expandidas dos meses post-trasplante: durante el seguimiento, no se detectaron eventos adversos graves atribuibles a la infusión de células Tregs, episodios de rechazo o incremento de infecciones<sup>[301]</sup>. En el presente año se han publicado los datos del ONE Study, un ensayo clínico multicéntrico de fase 1/2a, en el cual se evaluó la seguridad y eficacia de la infusión de diferentes células reguladoras (Tregs, CDs tolerogénicas, macrófagos reguladoras), administradas por separado, en receptores renales de donante vivo durante en el periodo perioperatorio<sup>[302]</sup>. Después de 60 semanas, los pacientes tratados con las células reguladoras tenían menor incidencia de infecciones oportunistas y, más importante, 15 de los 38 pacientes tratados con células reguladoras estaban en monoterapia con tacrolimus al final del estudio, mientras que, todos los pacientes del grupo control (sin infusión de células reguladoras) continuaron con terapia dual (tacrolimus y micofenolato). Finalmente, en el último estudio clínico realizaron una infusión de Tregs policlonales expandidas a 11 pacientes siete días después del trasplante renal: lo más destacado de sus resultados fue que después de tres años, ocho pacientes estaban mantenidos en monoterapia<sup>[303]</sup>.

En general, estos trabajos demostraron que la terapia adoptiva de células Tregs es factible, segura y potencialmente eficaz en el contexto de trasplante. Además, la información recabada de estos ensayos clínicos es fundamental para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas con células Tregs en humanos. Sin embargo, aún no se han publicado ensayos clínicos de células Tregs aloespecíficas en pacientes candidatos a trasplante renal o en pacientes con trasplante renal que aún son mantenidos bajo un régimen inmunosupresor.

**Tabla 6 | Terapia adoptiva de células Tregs en humanos en pacientes con trasplante de órganos sólidos.**

Trasplante (# de pacientes)	Tregs Infundidas	Pureza	Dosis	No. de dosis (tiempo PT)	Terapia de Mantenimiento	Resultados clínicamente relevantes	Ref.
Hepático de donador vivo (n=7)	Enriquecimiento de linfocitos del receptor anérgicos	Sin datos	3.6 ± 2.0×10 <sup>6</sup> /kg de masa corporal	1 (día +13)	Esteroides, MMF, tacrolimus	En 5.9 años PT: ausencia de eventos adversos relacionados a la infusión; sin ↑ de infecciones, neoplasia maligna <i>de novo</i> , enfermedades metabólicas, episodios de rechazo o Acs-ADE; histopatología de biopsias normales; supervivencia del paciente e injerto del 100%; todos los pacientes se mantuvieron sin inmunosupresión.	[298, 299]
Renal de donador vivo (n=3)	CD4 <sup>+</sup> CD127 <sup>low</sup> CD25 <sup>+</sup> de SP del receptor expandidas policlonalmente	>93% FOXP3 <sup>+</sup>	320 x 10 <sup>6</sup> (total)	1 (6 meses)	Tacrolimus, MMF +/- prednisona	En 1.5 años PT: ausencia de eventos adversos relacionados a la infusión: sin ↑ infecciones oportunistas o malignidades <i>de novo</i> ; Tregs infundidas detectadas tres meses después; supervivencia del paciente y el injerto de 100%.	[300]
Renal de donador vivo (n=9)	CD8-CD19-CD25 <sup>+</sup> de SP del receptor expandidas policlonalmente	>90% FOXP3 <sup>+</sup>	0.5, 1 o 5 × 10 <sup>9</sup> (total)	1 (día +60)	MMF, Tacrolimus (0 al día +30); cambio a MMF, rapamicina (día +30)	En 2 años PT: sin eventos adversos relacionados a la infusión de Tregs; histopatología de biopsias normales; sin ↑ infecciones severas, malignidades <i>de novo</i> o Acs-ADE; la infusión de Tregs no interfieren con la reconstitución inmunológica (CD4, CD8, células B, monocitos, NK); supervivencia del paciente/injerto del 100%.	[301]
Renal de donador vivo (n=38)	• Tregs del receptor expandidas • Células dendríticas tolerogénicas • Macrófagos reguladores	Sin datos	0.5 a 10 x 10 <sup>6</sup> /kg de masa corporal	1 (días -7 al +10)	Prednisona (0 a +15sem); MMF, Tacrolimus	En 60 semanas PT: sin eventos adversos relacionados a la infusión de Tregs; sin ↑ de episodios de rechazo, malignidades <i>de novo</i> o Acs-ADE: la función renal e histopatología de biopsias normales: 15 pacientes mantenidos en monoterapia con tacrolimus; ↓ incidencia de infecciones; supervivencia de paciente e injerto del 100%.	[302]
Renal de donador vivo (n=11)	CD8-CD19-CD25 <sup>+</sup> de SP del receptor expandidas policlonalmente	>95% FOXP3	0.5, 1.0 o 2.5 10 x 10 <sup>6</sup> /kg de masa corporal	1 (días +7)	Prednisona (0 a +14sem), MMF (0 a +48 sem), Tacrolimus	En 3 años PT: sin eventos adversos relacionados a la infusión de Tregs; sin ↑ de episodios de rechazo, malignidades <i>de novo</i> o Acs-ADE: la función renal e histopatología de biopsias normales: 8 pacientes mantenidos en monoterapia con tacrolimus; ↓ incidencia de infecciones; la infusión de Tregs no interfieren con la reconstitución inmunológica; supervivencia de paciente e injerto del 100%.	[303]

SP, sangre periférica; ↓, disminución; ↑ incremento; CsA, ciclosporina A; MMF, micofenolato de mofetilo; →, cambio; Acs-ADE, anticuerpos anti-donador específicos; PT, post-trasplante.

## 2. JUSTIFICACIÓN

El trasplante de riñón es indiscutiblemente el tratamiento de elección para la mayoría de los pacientes con enfermedad renal crónica (ERC). El principal objetivo después del trasplante es evitar el rechazo, un proceso caracterizado por una respuesta inflamatoria mediada principalmente por células T. Con la introducción de fármacos inmunosupresores, dirigidos a eliminar las células T o inhibir sus funciones efectoras, se redujo significativamente la incidencia de rechazo agudo. Sin embargo, las tasas de supervivencia del injerto renal a largo plazo siguen siendo subóptimas debido a la morbilidad y mortalidad asociadas con el tratamiento con inmunosupresores a largo plazo, caracterizado por un incremento en la susceptibilidad al desarrollo de patologías cardiovasculares, neoplásicas e infecciosas, las cuales a su vez representan las principales causas de muertes en los receptores renales. Debido a lo anterior, las actuales investigaciones se han enfocado en desarrollar inmunoterapias dirigidas a regular específicamente las células T aloespecíficas implicadas en la patogénesis del rechazo del aloinjerto y que permitan en un futuro sustituir parcial o totalmente la terapia con fármacos inmunosupresores.

Una creciente cantidad de investigaciones apoyan el papel de las células Tregs FOXP3<sup>+</sup> en la inducción y mantenimiento de tolerancia al trasplante, por lo cual, ha habido un gran interés en desarrollar terapias fundamentadas en la transferencia adoptiva de células Tregs. La inmunoterapia basada en células Tregs en humanos podría tener 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, las células Tregs pueden establecer la tolerancia inmunológica y tener efectos terapéuticos a largo plazo, como ha sido demostrado en estudios preclínicos. Por lo tanto, el presente trabajo contribuirá a la reciente información que se está recabando para la implementación de células Tregs como inmunoterapia en pacientes con trasplante renal. Además, realizar aportaciones biotecnológicas que optimicen la terapia actual de pacientes con trasplante renal representa una necesidad nacional que impactará directamente en los mexicanos en edad productiva, además de convertirse en una solución para la población mayoritaria en espera de trasplante de un órgano vital.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Una limitante para la aplicación clínica de células Tregs FOXP3<sup>+</sup> en humanos es el número limitado de esta subpoblación en sangre las cuales serían insuficientes para obtener el efecto terapéutico deseado. La expansión *ex vivo* permitiría superar este obstáculo, por lo que se han publicado diversos protocolos estimulando las células Tregs con anti-CD3/-CD28 (policlonal) o con células presentadoras de antígeno (antígeno-específico) en presencia de IL-2. Sin embargo, a pesar de que el estudio de células Tregs en el contexto de trasplante es un área de investigación de gran interés por el potencial terapéutico que representaría, la mayoría de los protocolos de expansión *ex vivo* (policlonales o aloespecíficas) disponibles se han realizado usando células Tregs provenientes de individuos sanos y aún son muy limitados los estudios con pacientes candidatos a trasplante renal o en pacientes que han recibido un trasplante renal. Aunado a lo anterior, recientemente nuestro grupo de investigadores reportó que receptores renales tratados con BLT a largo plazo tienen una disminución de su expresión de FOXP3 y su función supresora disminuida<sup>[272]</sup>. En el presente trabajo se evaluará si es factible la expansión *ex vivo* de células Tregs (policlonales o aloespecíficas) de pacientes con ERC y de receptores renales tratados a largo plazo con BLT para obtener células Tregs funcionalmente estables que puedan ser usadas como inmunoterapia.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Expandir *ex vivo* células T reguladoras aloespecíficas de pacientes con trasplante renal y evaluar su fenotipo inmunosupresor.

### **5. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Expandir *ex vivo* células Tregs policlonales de pacientes con trasplante renal Tx-BLT.
2. Evaluar la expresión de moléculas inmunorreguladoras (FOXP3, CD25, CTLA-4, Helios, entre otros) y la función supresora *in vitro* en células Tregs de pacientes tratados con BLT expandidas policlonalmente.
3. Evaluar *in vitro* el efecto de un microambiente inflamatorio sobre la expresión de moléculas inmunorreguladoras y la función supresora de las células Tregs de pacientes Tx-BLT expandidas.
4. Aislar y expandir *ex vivo* células Tregs aloespecíficas de pacientes ERC candidatos a trasplante renal.

5. Analizar la expresión de moléculas inmunorreguladoras y la función supresora de células Tregs aloespecíficas de pacientes con ERC expandidas.
6. Estudiar el efecto de un microambiente inflamatorio sobre la expresión de moléculas inmunorreguladoras y la función de las células Tregs aloespecíficas expandidas *in vitro*.
7. Determinar la desmetilación de citosinas de la TSDR en el locus de *Foxp3* de células Tregs expandidas *ex vivo*.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. Sujetos

#### **Población en Estudio**

Se incluyeron pacientes con trasplante renal tratados con belatacept (BLT) y pacientes diagnosticados con ERC reclutados en el INCMN-SZ y del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (INC-ICH). Un grupo control de individuos sanos se reclutó en el banco de sangre del Instituto de Enfermedades Respiratorias. Para realizar el estudio, se contó con la previa aprobación del protocolo por el Comité Institucional de Investigación Bioética en Humanos del INCMN-SZ, y del INC-ICH, así como el Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. El estudio se realizó en conformidad con la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, la Declaración de Estambul de las Sociedades Internacionales de Trasplantes y de Nefrología, y con las Buenas Prácticas Clínicas. Los individuos fueron incluidos en el presente estudio una vez explicado el protocolo y habiendo firmado la carta de consentimiento informado.

#### **Grupos de Estudio**

- Grupo A: Individuos sanos, que cumplieron con los criterios de inclusión.
- Grupo B: Pacientes con trasplante renal tratados con BLT (Tx-BLT) incluidos en el estudio BENEFIT que cumplieron con los criterios de inclusión. Todos los pacientes recibieron terapia de inducción con basiliximab. Para la terapia de mantenimiento se administró: BLT (dosis de 5 mg/kg cada 4 semanas), micofenolato de mofetilo (1 g/día) y prednisona (5 mg/día). BLT fue provisto por el Bristol Myers Squibb y se contó con la aprobación de dicha compañía para la realización del protocolo de investigación.
- Grupo C: Pacientes diagnosticados con ERC que cumplieron con los criterios de inclusión.

### **Criterios de Inclusión**

- Grupo A:

1. Individuos sanos sin antecedentes de enfermedad neoplásica, inflamatoria crónica o proceso infeccioso activo, que aceptaron participar en el estudio.
2. Ambos sexos, con edad entre 18 y 50 años.

- Grupo B:

1. Receptores de primer trasplante renal de donante vivo Tx-BLT, y que aceptaron participar en el estudio.
2. Ambos sexos, con edad entre 18 y 50 años.
3. Ausencia de enfermedad neoplásica, inflamatoria crónica o proceso de rechazo activo.

- Grupo C:

1. Pacientes con ERC candidatos a un primer trasplante, que contaban con un donante vivo seleccionado, y que aceptaron participar en el estudio.
2. Ambos sexos, con edad entre 18 años y 50 años.
3. Ausencia de enfermedad neoplásica o inflamatoria crónica.

### **Criterios de Exclusión:**

- Grupo A, B y C

1. Negativa a firmar el consentimiento informado.
2. Pacientes con proceso infeccioso sistémico agudo en la toma de muestra.

### **Criterios de Eliminación.**

- Grupo A, B y C

1. Sujetos en los que no se logró obtener el número de células Tregs necesarias para cumplir con los requisitos de nuestro modelo experimental.

## **6.2. Materiales y reactivos**

Anti-CD25 PECy5 y anti-LAG-3 R700 fueron obtenidos de BD Biosciences (San José, E.U.A.). Anti-CD4 APC, anti-CD8 PECy7 y Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Kit fueron de Tonbo Biosciences (San Diego, E.U.A.). Anti-FOXP3 Alexa Fluor 647 de Beckman Coulter (Brea, E.U.A.). Anti-CD25 PE, anti-CTLA-4 PECy7, anti-CCR7 APC-Cy7, anti-Helios FITC, anti-CD39 Brilliant Violet 711, Zombie NIR Fixable Viability Kit y Zombie Aqua Fixable Viability Kit se obtuvieron de Biolegend (San Diego, E.U.A.). Anti-CD3 PECy5, anti-CD8 Pacific Blue, Carboxy Fluorescein Succinimidyl Ester (CFSE), CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit (CTV), Dynabeads Human T-activator CD3/CD28 (perlas anti-CD3/anti-CD28), DynaMag-5™ Magnet (DynaMag), CTST™ OpTmizer™ T Cell Expansion SFM medium (medio de expansión), L-Glutamina 100X, Piruvato de Sodio 100X, Aminoácidos No-Esenciales 100X, Azul de Tripano (0.4 %), medio de cultivo RPMI

1640 y suero fetal bovino (SFB) se obtuvieron de Thermo Fisher Scientific (Waltham, E.U.A.). Albúmina Sérica Bovina (BSA), Rapamicina, ATRA (ácido holo-transretinoico) y dimetilsulfóxido (DMSO) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (San Luis, USA). Las citocinas humanas recombinantes IL-2, IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, TGF- $\beta$  y TNF- $\alpha$  de PeproTech (Nueva Jersey, E.U.A.). Todos los medios de cultivo se suplementaron con L-Glutamina, piruvato de sodio, aminoácidos no-esenciales y antibiótico-antimicótico. Todos los cultivos se realizaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

### **6.3. Separación y criopreservación de células mononucleares**

Se obtuvo sangre periférica por punción venosa mediante el sistema Vacutainer, la toma se realizó por la mañana y con ayuno previo de 8 horas. La sangre se diluyó en PBS 1X en una relación de 1:2, se estratificó en un gradiente de densidad en 1 mL Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare, Reino Unido) por cada 3 mL de sangre diluida, se centrifugó a 2000 rpm durante 30 minutos a 18 °C. Las células mononucleares (CMNs) se recolectaron a partir de la interfase, se lavaron dos veces con PBS 1X, y una vez con medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de SFB y se contaron las células. Para algunos ensayos, se criopreservaron CMNs en una solución que contiene 90% SFB y 10% DMSO durante 24 horas a -70 °C, y posteriormente se transfirieron a nitrógeno líquido para su almacenamiento a largo plazo. Para los ensayos funcionales, las CMNs se descongelaron en un baño de agua a 37°C, se recolectaron en RPMI suplementado con 10% SFB (37°C), se lavaron dos veces con el mismo medio, se suspendieron en la solución apropiada y se contaron las células. Todos lavados celulares se realizaron centrifugando durante 5 minutos a 1500 rpm. Para todos los conteos celulares, se determinó la viabilidad celular por exclusión con azul tripano.

### **6.4. Purificación de células Tregs**

Las CMNs se tiñeron con anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos anti-CD4, anti-CD25 y anti-CD127 durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Posteriormente, las células se lavaron con PBS 1X (centrifugando durante 5 minutos a 1500 rpm) y se purificaron las células Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> o CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>-</sup> usando el citómetro de flujo FACS Aria™ I (BD). Las células purificadas se colectaron en medio de cultivo RPMI suplementado con 20% SFB, se centrifugaron (1500 rpm durante 10 min) y se lavaron con medio de expansión suplementado con 10% de suero humano AB (SH-AB) (Gemini Bio Products, Sacramento, E.U.A.). Al final, las células se suspendieron en medio de expansión con 10% SH-AB, se contaron las células para los posteriores ensayos.

### 6.5. Expansión policlonal de células Tregs

Las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> purificadas de individuos sanos o de pacientes Tx-BLT fueron cultivadas en medio de expansión suplementado con 10% SH-AB e IL2 (200-300 UI/mL) y se estimularon con perlas magnéticas acopladas con anti-CD3/anti-CD3 en distintas proporciones perlas:Tregs (1:1 o 2:1) en presencia de rapamicina (100 ng/mL). En el día 4 de expansión, las perlas magnéticas fueron removidas usando el DynaMag, se lavaron las células y se cultivaron en medio de expansión suplementado con 10% SH-AB e IL-2 (50-100 UI/mL) durante tres días (reposo o “resting”). Tres rondas adicionales de estimulación/reposo fueron realizadas (Figura 10a). En los días 0, 14 y 28 de expansión se determinó el fenotipo de las células Tregs mediante citometría de flujo (Sección 7.11). En el día 28, se realizaron ensayos de supresión policlonal *in vitro* (Sección 7.6) y una muestra de células Tregs fueron estimuladas una semana más en presencia de citocinas inflamatorias IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-4 y TNF- $\alpha$  (en concentración de 10 ng/mL cada citocina).

### 6.6. Ensayo de supresión policlonal *in vitro*

Las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> de individuos sanos o de pacientes BLT expandidas fueron co-cultivadas con CMNs autólogas (descongeladas y marcadas con 5  $\mu$ M CFSE, siguiendo las instrucciones del fabricante) en distintas proporciones Tregs: CMNs (0:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16) en medio RPMI 10% SH-AB. Las células fueron estimuladas con perlas anti-CD3/-CD28 (proporción de 1 perla: 10 células) e incubadas 4 días. En algunos co-cultivos se adicionaron IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-4 y TNF- $\alpha$  en una concentración de 10 ng/mL para cada citocina. Posteriormente, se realizó una tinción superficial con anti-CD4 y anti-CD8 durante 20 min a 4°C en la oscuridad, se lavaron con solución amortiguadora FACS (PBS 1X, 2% SFB, EDTA 2 mM, 0.01% azida de sodio); al final, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% (incubando 5 min a 4°C) y lavadas con solución FACS. Las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo Attune® Acoustic Focusing (Life Technologies) 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 (Tree Star, USA). Ver estrategia de análisis en la Figura B del anexo II. Para calcular el porcentaje de supresión se utilizó la siguiente fórmula:

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

### **6.7. Células dendríticas derivadas de monocitos (CDs-Mo)**

Se purificaron monocitos CD14<sup>+</sup> de las CMNs (provenientes de donadores de trasplante renal o individuos sanos) mediante el uso de kit Human CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se descongelaron las CMNs (sección 7.3), se lavaron con solución MACS (PBS 1X, BSA 0,5 %, EDTA 2 mM); después, se adicionaron 10 µL de CD14 MicroBeads por cada 10<sup>7</sup> de CMNs y se incubaron 20 min/ 4 °C. Posterior a la incubación, las células se lavaron con solución MACS; los monocitos CD14<sup>+</sup> fueron separados por selección positiva usando una columna magnética MACS (Miltenyi Biotec) y se lavaron con RPMI 10% SH-AB. Al final, los monocitos CD14<sup>+</sup> aislados se cultivaron durante 8 días en RPMI 10% SH-AB suplementado con IL-4 (50 ng/mL) y GM-CSF (50 ng/mL); en los días 3 y 5 se realizaron cambios de medio de cultivo con citocinas.

### **6.8. Aislamiento y expansión *ex vivo* de Tregs aloespecíficas**

Las células Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>-</sup> de individuos sanos o de pacientes con ERC se marcaron con CTV, siguiendo las instrucciones del fabricante, y se co-cultivaron con CDs-Mo alogénicas en distintas proporciones Tregs:CDs (1:1 o 2:1) en medio de expansión suplementado con 10% SH-AB, IL-2 (500-1000 UI/mL) y ATRA (10 µM). En el día 7 de cocultivo, se purificaron las células Tregs proliferantes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CFSE<sup>-</sup> (aloespecíficas) usando citómetro de flujo MoFlo XDP (Beckman Coulter), colectando las células en medio de cultivo RPMI 20% SFB. Las células Tregs aloespecíficas purificadas se lavaron con medio de expansión 10% SH-AB y se cultivaron en medio de expansión suplementado con 10% SH-AB e IL-2 (50-100 UI/mL) durante 3 días. Posteriormente, las células Tregs aloespecíficas fueron expandidas policlonalmente en medio de expansión 10% SH-AB realizando cuatro ciclos de estimulación/reposo, cada uno de 7 días, que consistieron en lo siguiente (Figura 10): cuatro días de estimulación con perlas anti-CD3/anti-CD28 en distintas proporciones Tregs: perla (1:1, 1:2), rapamicina (100 ng/mL), TGF-β (2.5-5 ng/mL) e IL-2 (200-400 UI/mL); seguido de tres días de reposo en medio de expansión suplementado con 10% SH-AB e IL-2 (50-100 UI/mL). Después de las 4 semanas de expansión policlonal, se realizaron ensayos de supresión *in vitro* aloespecífico (Sección 7.10) y una muestra de las células Tregs fueron estimuladas una semana más en presencia de citocinas inflamatorias IFN-γ, IL-6, IL-4 y TNF-α (en concentración de 10 ng/mL c/u). Además, una muestra de las células Tregs expandidas se criopreservaron siguiendo el protocolo de la sección 7.3.

### **6.9. Ensayo de supresión aloantígeno específico *in vitro***

Primero, se purificaron células Tconv CD3<sup>+</sup> de las CMNs descongeladas de individuos sanos o de pacientes utilizando Pan T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las CMNs se lavaron con solución MACS centrifugando durante 5 minutos a 1500 rpm: se adicionaron 10 µL del cóctel de anticuerpos biotinilados (anti-CD14, -CD16, -CD19, -CD36, -CD56, -CD123 y -Glicoforina A) por cada 10<sup>7</sup> de CMNs e incubó 20 min a 4 °C: después, se adicionó 20 µL de anti-Biotin MicroBeads e incubó 15 min a 4 °C. Posteriormente, las células se lavaron con solución MACS y las células T fueron separadas por selección negativa.

Las células Tregs aloespecíficas expandidas fueron marcadas con CTV y co-cultivadas con células T CD3<sup>+</sup> convencionales (Tconv) autólogas (marcadas con CFSE) en una proporción 1 Treg: 4 células Tconv. Las células se estimularon con CDs-Mo alogénicas en medio de expansión con 10% SH-AB. En algunos co-cultivos se adicionaron IFN-γ, IL-6, IL-4 y TNF-α en una concentración de 10 ng/mL por cada citocina. Al día 4, se realizó una tinción superficial con anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD3 durante 20 minutos a 4°C en oscuridad, se lavaron con solución FACS y las células se fijaron con paraformaldehído al 2%. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo 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. Ver estrategia de análisis en la Figura D del Anexo II. Para calcular el porcentaje de supresión se utilizó la fórmula de la sección 7.6.

### **6.10. Análisis del fenotipo por citometría de flujo**

Muestras de células Tregs expandidas se marcaron superficialmente con anti-CD4, anti-CD25, anti-CCR7, anti-LAG-3, anti-CD39 y el marcador de viabilidad Zombie durante 20 min a temperatura ambiente en oscuridad; después, las células se lavaron con amortiguador FACS. Para la tinción intracelular se utilizó Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Kit siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, después del lavado con la solución FACS, las células se suspendieron en la solución de Fijación/Permeabilización (1 parte de la solución concentrada con 3 partes del diluyente) y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad; luego, las células se centrifugan (1500 rpm durante 5 min) y se lavaron con solución de Permeabilización 1X. Posterior a esto, se realizó la tinción con anti-FOXP3, anti-Helios y anti-CTLA-4 durante 30 min a 4°C en oscuridad; al final, las células se lavaron con solución de Permeabilización 1X. Las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo Attune® y los resultados (frecuencias e Intensidades Medianas de Fluorescencia) se analizaron con el programa FlowJo vX.0.7. Ver estrategia de análisis en la Figura A del anexo II.

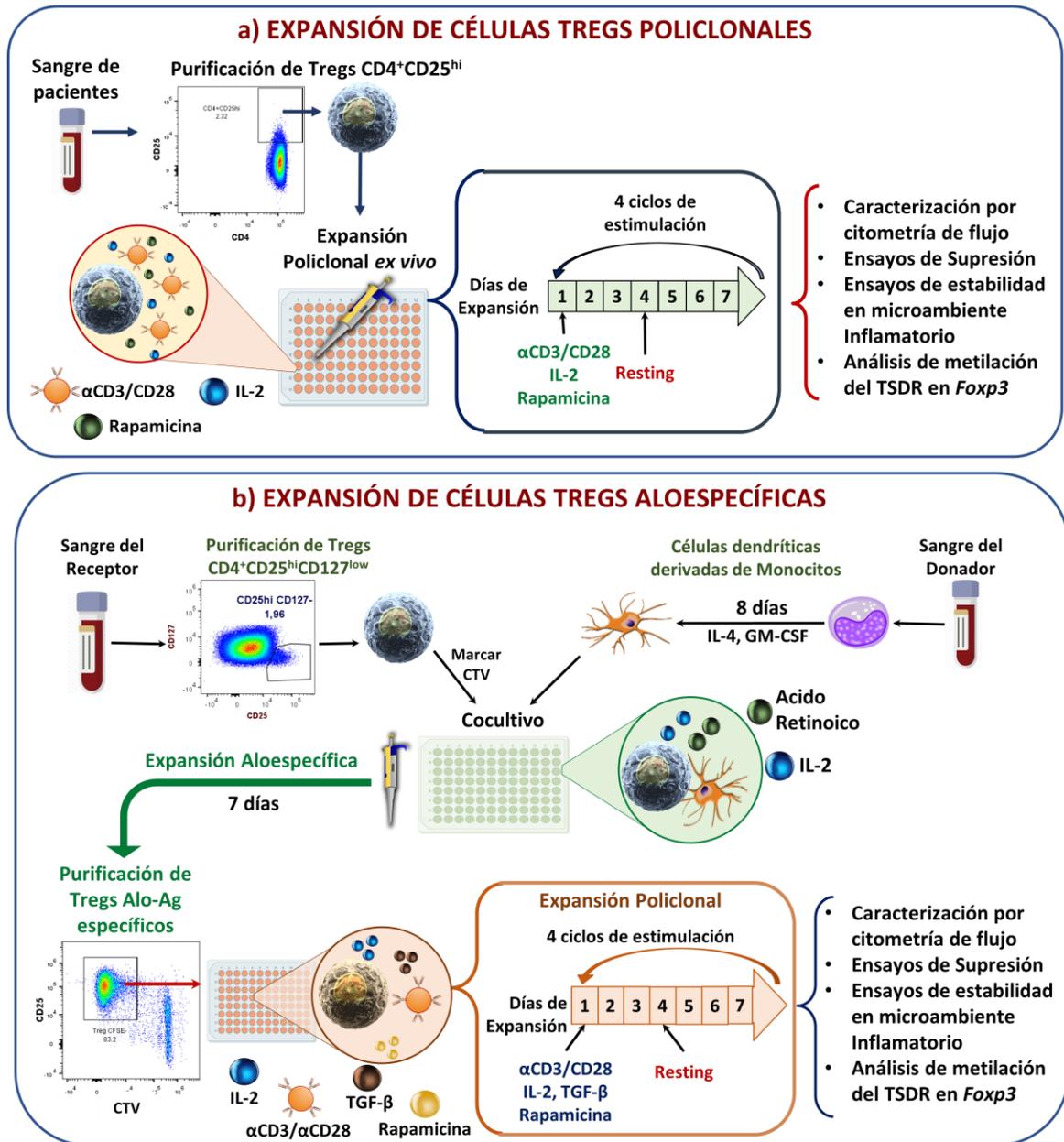
### **6.11. Análisis de la metilación de la TSDR en el gen de *Foxp3***

Para la extracción de ADN y tratamiento con bisulfito de sodio se usó el kit EZ DNA Methylation Direct (Zymo Research Corp., E.U.A), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los siguientes cebadores fueron usados para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando el ADN tratado con bisulfito de sodio: p-5'-TGATTTGTTTGGGGGTAGAGGATTTAGAG-3' y o-5'-TATCACCCACCTAAACC AACCTACTACA-3'. Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C por 15 min y 40 ciclos de 95 °C por 1 min, 62.5 °C por 1 min, y 72 °C por 1 min, y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron purificados usando QIAEX II gel extraction kit (Qiagen, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante, y estos productos fueron clonados usando el pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, E.U.A), siguiendo las instrucciones de cada fabricante. Las bacterias *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (quimiocompetentes) fueron transformadas con los vectores recombinantes; las colonias bacterianas positivas fueron seleccionadas individualmente, de las cuales se purificó el ADN plasmídico recombinante usando el Mini Kit de Extracción de Plásmido FavorPrep (Favorgen, Pingtung, Taiwán). Los plásmidos fueron secuenciados con 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific). Las secuencias se analizaron utilizando el programa MEGA-X (Universidad Estatal de Pensilvania, E.U.A).

### **6.12. Análisis Estadístico**

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa de cómputo GraphPad Prism 6.01 (San Diego, E.U.A). Para determinar la distribución de los datos, se utilizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Las pruebas T de Student pareada o no pareada fueron usadas para comparar los datos de dos grupos con distribución normal; la prueba de la Suma de rangos de Wilcoxon o la prueba U de Mann-Whitney se utilizaron para comparar datos de dos grupos pareados o no pareados con distribución no normal, respectivamente. Las diferencias entre más de dos grupos se calcularon utilizando la prueba ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis para datos con distribución normal o no normal, respectivamente. Los gráficos se expresan como Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (EEM). Los valores con  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## 6.13. Diagrama de Flujo



**Figura 10. Esquemas de los protocolos de aislamiento y expansión *ex vivo* de células Tregs.** a) Protocolo de expansión de células Tregs policlonales usado para muestras de los pacientes con trasplante renal tratados a largo plazo con belatacept y de sus respectivos controles sanos. b) Protocolo de expansión de células Tregs aloespecíficas usado para muestras de los pacientes con ERC y de sus respectivos controles.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Expansión *ex vivo* de células Tregs policlonales de receptores renales tratados con BLT

#### 7.1.1. La expansión de células Tregs de los pacientes Tx-BLT aumenta la expresión del FOXP3 y su función supresora

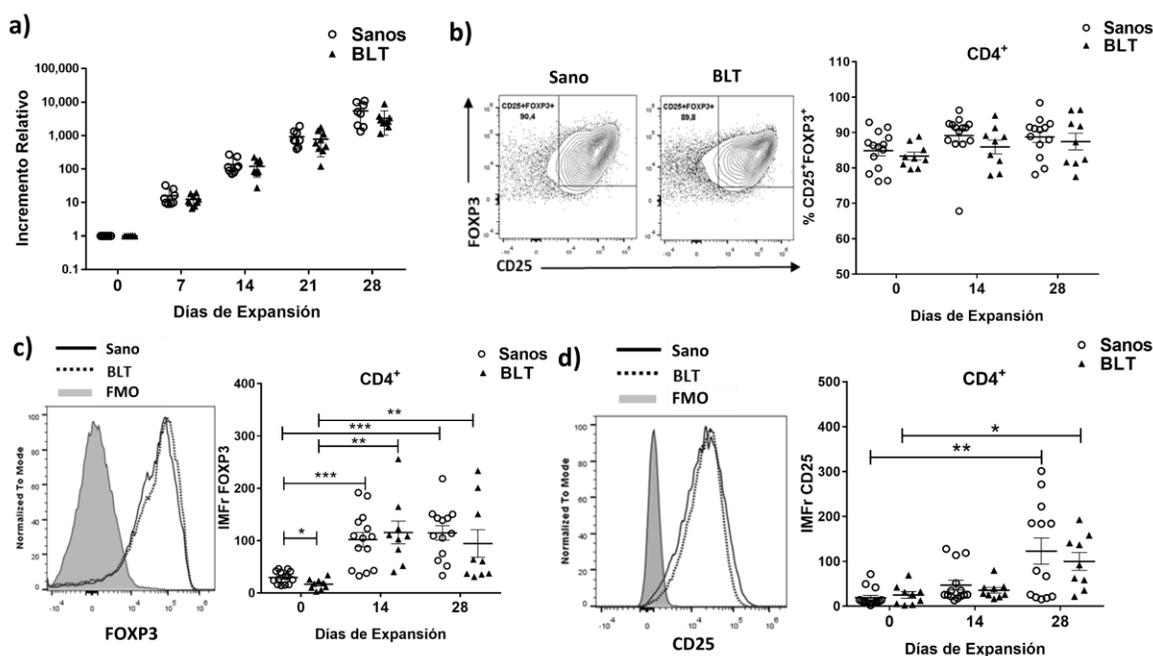
En un estudio previo de nuestro grupo, se reportó una disminución de la proporción de células Tregs en sangre de pacientes con trasplante renal tratados con belatacept (Tx-BLT) a largo plazo, en comparación con individuos sanos<sup>[272]</sup>. Además, las células Tregs de los pacientes tenían disminuidos tanto la expresión del FOXP3, como, su capacidad supresora *in vitro*<sup>[272]</sup>. Para investigar si la expansión *ex vivo* podría restaurar la expresión del FOXP3 y la función de las células Tregs de los pacientes sometidos a terapia inmunosupresora a largo plazo, se aislaron las células Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> de los pacientes Tx-BLT o de individuos sanos (grupo control), y se expandieron policlonalmente con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 e IL-2 en presencia de rapamicina (poliTregs). En la tabla 8 se presentan los principales datos demográficos de los pacientes Tx-BLT incluidos en el presente trabajo. Después de cuatro semanas de expansión *ex vivo*, no hubo diferencia en la proliferación de las células Tregs de los pacientes Tx-BLT en comparación con los controles sanos en cada día evaluado (Figura 11a). Además, la proporción de las células T CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> en las Tregs purificadas (día 0) se mantuvo en las poliTregs de ambos grupos a lo largo de la expansión (Figura 11b).

**Tabla 7 || Datos demográficos de los receptores renales tratados con BLT.**

	Belatacept (n=9)	Control (n=9)
Edad (Años)	31.08 ± 10.1 (18-57)	35 ± 10.5 (24-54)
Genero (F/M)	5/4	5/4
Edad Donador (Años)	36.12 ± 9.47 (21-54)	N/A
Género Donador (F/M)	17/7	N/A
Haplotipos (2-H/ 1-H/0-H)	2/4/3	N/A
Causa de ERC	Desconocida: 3 Diabetes <i>mellitus</i> : 3 Glomerulonefritis: 3	N/A
TFGe (mL/min)	79.6 ± 16.5 (40.1-107.7)	N/A
Tiempo con trasplante (años)	7.28 ± 0.91 (5.9-8.67)	N/A

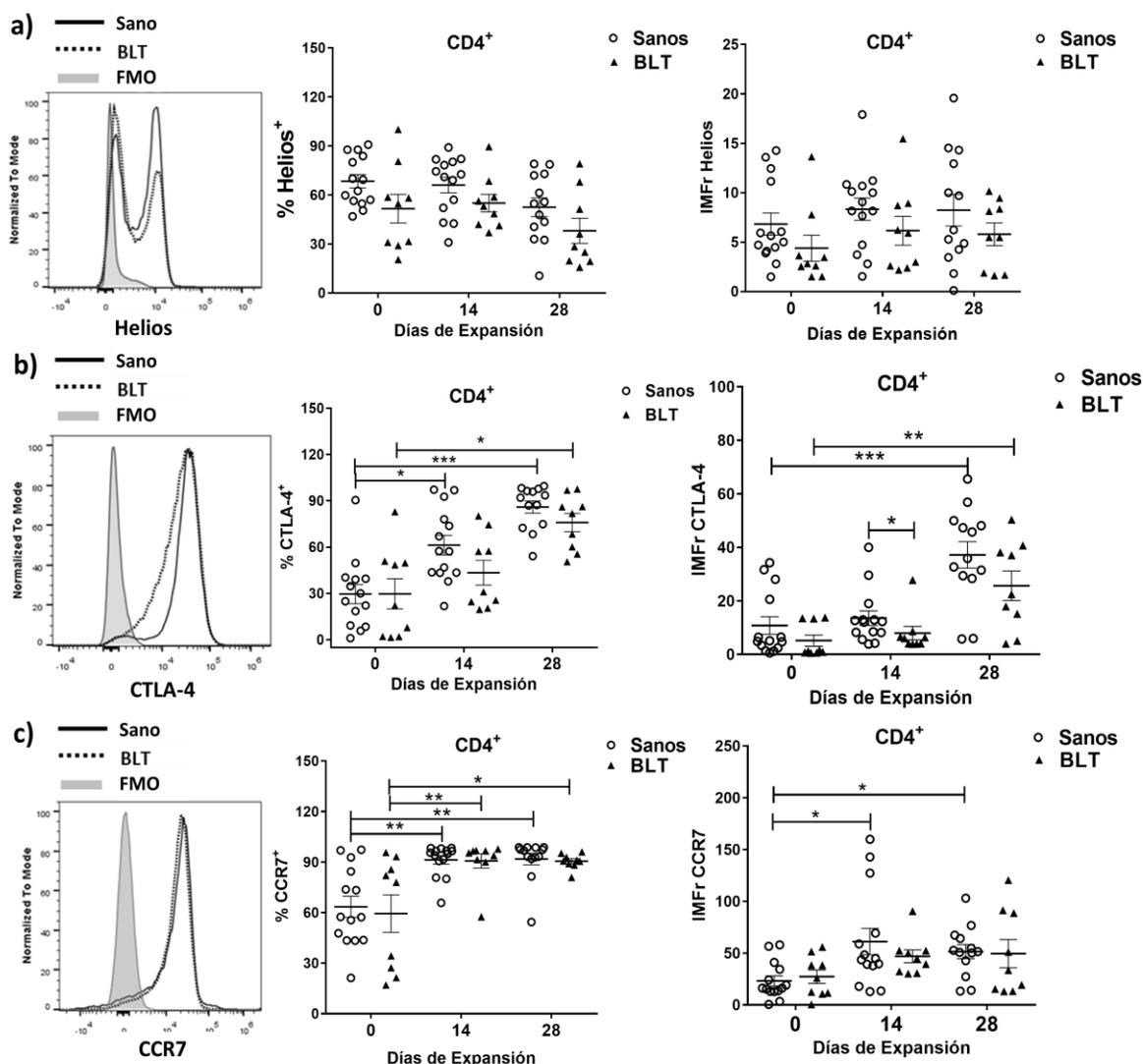
TFGe, tasa de filtración glomerular estimada; N/A, no aplica.

Similar al reporte anterior<sup>[272]</sup>, las células Tregs de los pacientes Tx-BLT expresaron niveles más bajos del FOXP3 (Intensidad Mediana de Fluorescencia, IMF) en el día 0 (Figura 11c: Sanos= 29.7 ± 11.8 vs BLT= 16.8 ± 10.0, p<0.05), pero de manera importante, este factor de transcripción fue incrementado significativamente en las <sup>poli</sup>Tregs de ambos grupos en los días 14 (Figura 11c: Sanos=102.0 ± 51.8, p<0.001; BLT=115.5 ± 64.5, p<0.01) y 28 (Figura 11c: Sanos=114.9 ± 50.5, p<0.001; BLT=94.5 ± 79.1, p<0.01) de expansión. Asimismo, en el día 28 de cultivo la expresión del CD25 aumentó significativamente en las <sup>poli</sup>Tregs de ambos grupos (Figura 11d: Sanos día 0= 19.0 ± 20.3 vs Sanos día 28= 122.7 ± 105.2, p<0.01; BLT día 0= 25.0 ± 22.0 vs BLT día 28= 99.8 ± 59.7, p<0.05). Es importante resaltar que, la expresión de ambas proteínas FOXP3 y CD25 en las <sup>poli</sup>Tregs fue similar entre ambos grupos de estudio en los días 14 y 28 de expansión (Figura 11c y d).



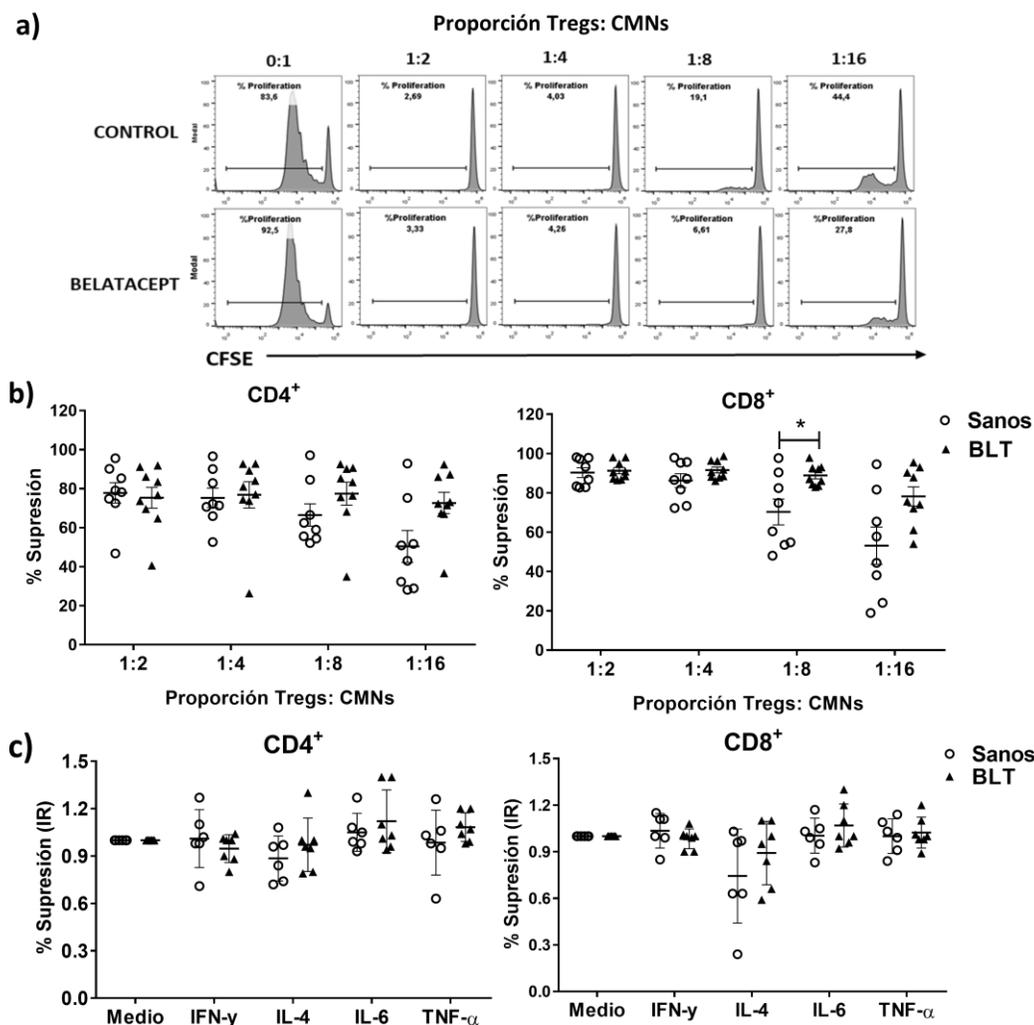
**Figura 11. Las células Tregs de los receptores renales tratados con belatacept aumentan la expresión del FOXP3 y CD25 después de ser expandidas *ex vivo*.** a-f) Las células Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> aisladas de sangre de receptores renales tratados con belatacept (BLT, triángulos negros) o controles (Sanos, círculos blancos) fueron expandidas durante 4 semanas con anti-CD3/anti-CD28 e IL-2 en presencia de rapamicina (protocolo Fig. 10a). La expresión de las proteínas CD25 y FOXP3 se evaluó mediante citometría de flujo (Estrategia de análisis: Figura A del anexo II). La proliferación de las células Tregs de pacientes Tx-BLT fue similar a las células Tregs de individuos sanos. El incremento relativo se calculó dividiendo el número de Tregs obtenidas en el día evaluado entre el número de células Tregs del día 0. b) La proporción de células CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> se mantuvo en células Tregs de ambos grupos expandidas a largo plazo. La expresión del FOXP3 (c) y CD25 (d) se incrementó en las células Tregs expandidas. La Intensidad Mediana de Fluorescencia relativa (IMFr), se calculó dividiendo la IMF de la muestra entre la IMF del control FMO. En los incisos b, c y d se muestran experimentos representativos del día 28 de expansión, y como control se utilizó FMO representado como histogramas grises. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba U de Mann-Whitney o la prueba de Suma de rangos de Wilcoxon. Los resultados se presentan como media ± error estándar de la media. Los resultados estadísticamente significativos se indican como \* p < 0.05, \*\*

Para una mejor caracterización de las células Tregs expandidas, se evaluó la expresión de otros marcadores típicos de células Tregs incluyendo Helios, CTLA-4 y CCR7. Helios, un miembro de la familia de los factores de transcripción Ikaros, es importante para la función inmunoreguladora de las células Tregs<sup>[304]</sup>. Como se muestra en la Figura 12a, después de 28 días de expansión, la proporción de las células Helios<sup>+</sup> y la expresión del mismo factor de transcripción se mantuvo en las <sup>poli</sup>Tregs de los pacientes Tx-BLT y de los controles sanos.



**Figura 12. Las células Tregs de los receptores renales Tx-BLT expandidas con rapamicina mantienen su expresión de Helios e incrementan su expresión del CTLA-4 y CCR7.** La expresión del Helios, CTLA-4 y CCR7 se evaluó mediante citometría de flujo (Estrategia de análisis: Fig. A del anexo II) en las células Tregs de pacientes Tx-BLT (triángulos negros) o de los controles sanos (círculos blancos) expandidas durante cuatro semanas (Fig. 11). a-c) Las células Tregs expandidas de los pacientes Tx-BLT y de los controles sanos mantienen tanto en el porcentaje como en la IMFr de Helios (a), así como un aumento en la expresión del CTLA-4 (b) y CCR7 (c). En los incisos a, b y c se muestran experimentos representativos del día 28 de expansión; como control se utilizó FMOs representados como histogramas grises. Los resultados se presentan como media  $\pm$  EEM. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba U de Mann-Whitney o la prueba de Suma de rangos de Wilcoxon. Los resultados estadísticamente significativos se indican como \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001.

CTLA-4 es un receptor coinhibitorio importante en la función mediada por las células Tregs, bloqueando la coestimulación de las células T<sup>[131]</sup>. Nuestros datos mostraron un aumento significativo en la frecuencia de las células CTLA-4<sup>+</sup> (Figura 12b: Sanos día 0= 29.6 ± 23.0 vs Sanos día 28= 86.0 ± 14.1 %, p< 0.001; BLT día 0= 29.8 ± 29.0 vs BLT día 28= 76.0 ± 17.7 %, p<0.05) y la expresión del CTLA-4 (Figura 12b: Sanos día 0= 10.8 ± 12.2 vs Sanos día 28= 37.2 ± 17.8, p< 0.001; BLT día 0= 5.15 ± 6.3 vs BLT día 28= 25.6 ± 16.6, p<0.01) en las Tregs de los pacientes Tx-BLT y de los individuos sanos después de la expansión.



**Figura 13. Las células Tregs de los pacientes Tx-BLT expandidas tienen una gran capacidad supresora *in vitro*.** En el día 28 de expansión, las células Tregs de los pacientes Tx-BLT (triángulos negros) o de individuos sanos (círculos blancos) se cocultivaron con células mononucleares (CMN) marcadas con CFSE y se estimularon con anti-CD3/anti-CD28. En el día 4 de cultivo, se determinó la proliferación de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> por dilución del CFSE (Estrategia de análisis: Fig. B del anexo II). a) Se muestra un experimento representativo. b, c) Las células Tregs de los pacientes tuvieron una alta capacidad supresora de la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> (izquierda) y CD8<sup>+</sup> (derecha) en todas las condiciones evaluadas (b), aún en presencia de citocinas inflamatorias (c). El incremento relativo (IR) del porcentaje de supresión se calculó dividiendo el porcentaje de supresión en presencia de la citocina entre el porcentaje de supresión en ausencia de citocinas (medio). Los resultados se presentan como media ± EEM. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba U de Mann-Whitney o ANOVA de una vía.

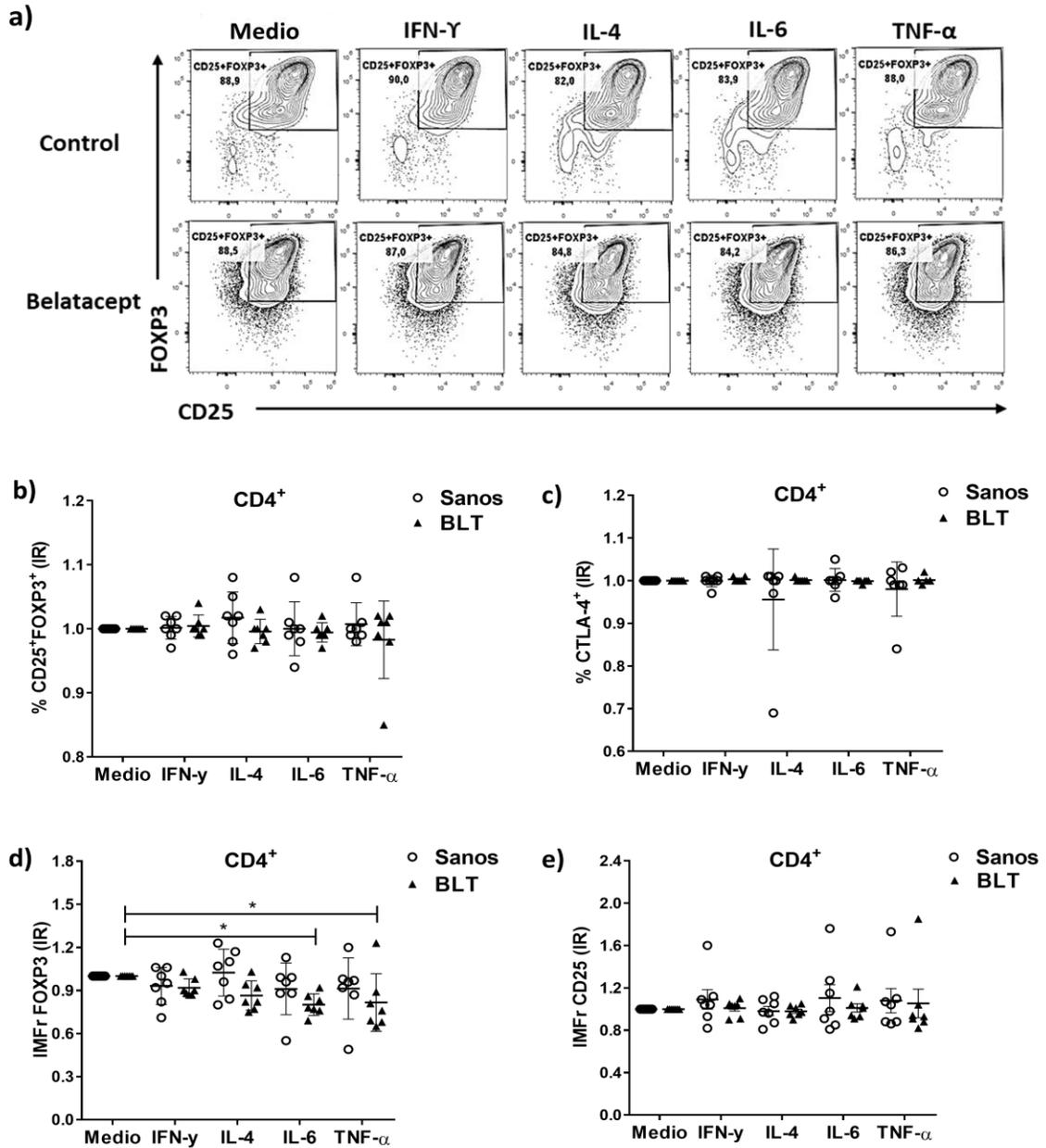
CCR7 participa en la migración de las células Tconv y las células Tregs a los ganglios linfáticos<sup>[305]</sup>. La proporción de las células CCR7<sup>+</sup> (Figura 12c: Sanos día 0= 63.5 ± 23.4% vs Sanos día 28= 91.8 ± 12.2 %, p<0.01; BLT día 0= 59.4 ± 33.4% vs BLT día 28= 90.5 ± 4.4 %, p<0.05) fue incrementado en las <sup>poli</sup>Tregs de los pacientes Tx-BLT y de los controles sanos como resultado de la estimulación *in vitro*.

Para evaluar si el aumento de la expresión de marcadores relacionados con una función inmunoreguladora, observado en las <sup>poli</sup>Tregs después de la expansión *ex vivo*, se correlaciona con una mayor capacidad funcional de estas células, se realizaron ensayos de supresión *in vitro*. De manera importante, las células Tregs de los pacientes Tx-BLT expandidas durante 14 días (datos no mostrados) y 28 días (Figuras 13a and b) suprimieron la proliferación de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> autólogas, de manera similar a las células Tregs de los controles sanos, en todas las proporciones evaluadas.

#### 7.1.2. Las células Tregs expandidas mantienen su función supresora ante un microambiente inflamatorio

Para evaluar la estabilidad funcional de las células Tregs expandidas en un microambiente inflamatorio, se realizaron ensayos de supresión *in vitro* en presencia de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6 o TNF- $\alpha$ . En la Figura 13c se muestra que las <sup>poli</sup>Tregs de pacientes Tx-BLT presentaron una gran capacidad para inhibir la proliferación de las células Tconv CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en presencia de cada citocina evaluada, similar a las <sup>poli</sup>Tregs de los controles sanos.

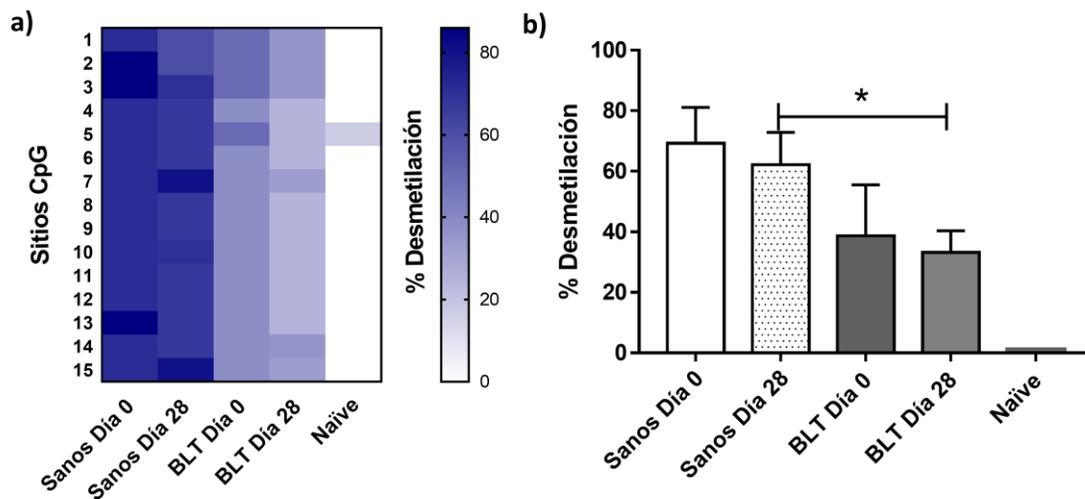
Para ahondar más en la estabilidad de las células Tregs, evaluamos el efecto de un microambiente inflamatorio en el fenotipo de las <sup>poli</sup>Tregs después de una semana adicional de expansión en presencia de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6 o TNF- $\alpha$ . Las <sup>poli</sup>Tregs de los pacientes y de los controles mantuvieron la proporción de células CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (Figura 14a y b) y CTLA-4<sup>+</sup> (Figura 14c) en todas las condiciones evaluadas. Además, la expresión de FOXP3 no disminuyó significativamente en las <sup>poli</sup>Tregs de ambos grupos cuando se expandieron en presencia de IFN- $\gamma$  e IL-4 (Figura 14d). Sin embargo, cuando las <sup>poli</sup>Tregs fueron estimulados en presencia de IL-6 o TNF- $\alpha$ , los niveles del FOXP3 disminuyeron significativamente sólo en las células Tregs de los pacientes Tx-BLT (Figura 14d). Por el contrario, la expresión CD25 no disminuyó ni en <sup>poli</sup>Tregs de los controles sanos, ni en las <sup>poli</sup>Tregs de los pacientes Tx-BLT, después de la activación en presencia de cualquier citocina inflamatoria (Figura 14e).



**Figura 14. Las células Tregs de los pacientes Tx-BLT expandidas disminuyen la expresión del FOXP3 en presencia de IL-6 y TNF- $\alpha$ .** En el día 28, las células Tregs expandidas de los controles sanos (círculos blancos) o de los pacientes Tx-BLT (triángulos negros) se estimularon una semana con anti-CD3/anti-CD28 en presencia o ausencia de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6 o TNF- $\alpha$ . La expresión de las moléculas CD25, CTLA-4 y FOXP3 se determinó mediante citometría de flujo (Estrategia de análisis: Fig. A del anexo II). a) Se muestra un experimento representativo. b-d) La activación de células Tregs de los pacientes tratados con BLT en presencia de citocinas inflamatorias no tuvo un efecto sobre el porcentaje de las células CD25+FOXP3+ (b) y CTLA-4+ (c), similar a las Tregs de los controles. d) La expresión del FOXP3 (IMF relativa) se mantuvo en las Tregs expandidas cuando se activaron en presencia de IFN- $\gamma$  e IL-4, pero esta expresión disminuyó significativamente sólo en las células Tregs de las pacientes activadas en presencia de IL-6 y TNF- $\alpha$ . El incremento relativo (IR) del porcentaje de las células o de la IMF se calculó dividiendo el valor en presencia de la citocina entre el valor en ausencia de citocinas (medio). Los datos se presentan como media  $\pm$  EEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de una vía. Los resultados estadísticamente significativos se indican como \*  $p < 0.05$ .

### 7.1.3. La expansión *ex vivo* de las células Tregs no restaura el estado de desmetilación de la TSDR en las Tregs de los pacientes Tx-BLT

Para determinar si el fenotipo y estabilidad funcional observada en las <sup>poli</sup>Tregs se asoció con su estado epigenético, se evaluó la desmetilación de citosinas en la TSDR (por sus siglas en inglés, *Treg-specific demethylated region*) del gen de *Foxp3*. Como se reportó anteriormente [272], el porcentaje de desmetilación en la TSDR de *Foxp3* en las células Tregs recientemente purificadas (día 0) fue menor en las Tregs de los pacientes Tx-BLT en comparación con los controles sanos (Figura 15a y b: Sanos= 69.3 ± 20.1 vs BLT= 38.7 ± 29.2, p= 0.212). Al final de la expansión *ex vivo* (día 28), la desmetilación de los sitios CpG de la TSDR fue menor en las células Tregs de los pacientes en comparación con células Tregs de individuos sanos (Figura 15a y b: Sanos= 62.2 ± 18.5 vs BLT= 33.2 ± 12.5, p= 0.087).



**Figura 15. La expansión *ex vivo* en presencia de rapamicina no restablece el estado de desmetilación en las células Tregs de los pacientes tratados con BLT.** El análisis de metilación de los sitios CpG del TSDR (por sus siglas en inglés *Treg-specific demethylated region*) en el gen *Foxp3* se evaluó en las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> antes (Día 0) y después de 4 semanas de expansión (Día 28). a) Cada cuadrado representa un sitio de CpG analizado. El código de color de la metilación varía de blanco (0% de desmetilación) a azul (100% de desmetilación) según la escala de colores. Las células T naïve muestran un TSDR completamente metilado y se usaron como control negativo. b) El porcentaje de desmetilación del TSDR de *Foxp3* fue menor en las células Tregs de los pacientes tratados con BLT en comparación con células Tregs de controles, y este estatus se mantuvo después de 4 semanas de expansión. Los datos se presentan como la media ± EEM. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student de dos colas. Los resultados estadísticamente significativos se indican como \* p < 0.05.

Los resultados de la expansión de células Tregs de pacientes con trasplante renal tratados con belatacept fueron recientemente publicados [306].

## 7.2. Expansión *ex vivo* de células Tregs aloespecíficas de pacientes con ERC

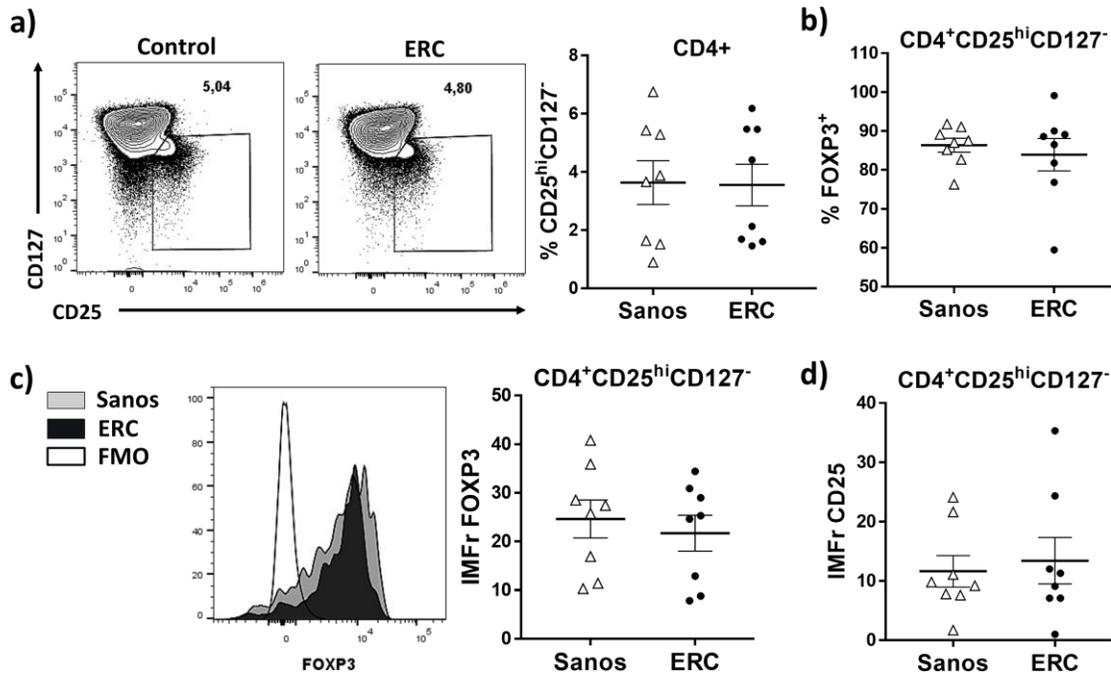
### 7.2.1. Las células Tregs de los pacientes con ERC mantienen su expresión de FOXP3 después de ser expandidas a largo plazo

La enfermedad renal crónica (ERC) es un proceso fisiopatológico multifactorial de carácter progresivo e irreversible que frecuentemente requiere terapia de reemplazo renal, es decir diálisis o trasplante<sup>[4]</sup>. Por tanto, los pacientes con ERC podrían ser candidatos a la inmunoterapia basada en células Tregs para la inducción de la tolerancia al trasplante, como alternativa al uso de fármacos inmunosupresores. Las características clínicas y demográficas de los pacientes con ERC que participaron en el presente estudio se encuentran resumidas en la tabla 9. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.

**Tabla 8 | Características demográficas de los pacientes con enfermedad renal crónica.**

	Pacientes con ERC (n=5)	Controles Sanos (n=14)
Edad (Años)	33.2 ± 12.5	38.5 ± 11.6
Genero (F/M)	2/3	6/8
Edad Donador (Años)	44.2 ± 13.5	N/A
Genero Donador (F/M)	3/2	N/A
Haplotipos (2-H, 1-H, 0-H)	0/3/2	N/A
Causa de ERC	Desconocida: 2 Nefropatía por IgA: 1 Diabetes mellitus tipo 2: 1 Hipoplasia renal: 1	N/A

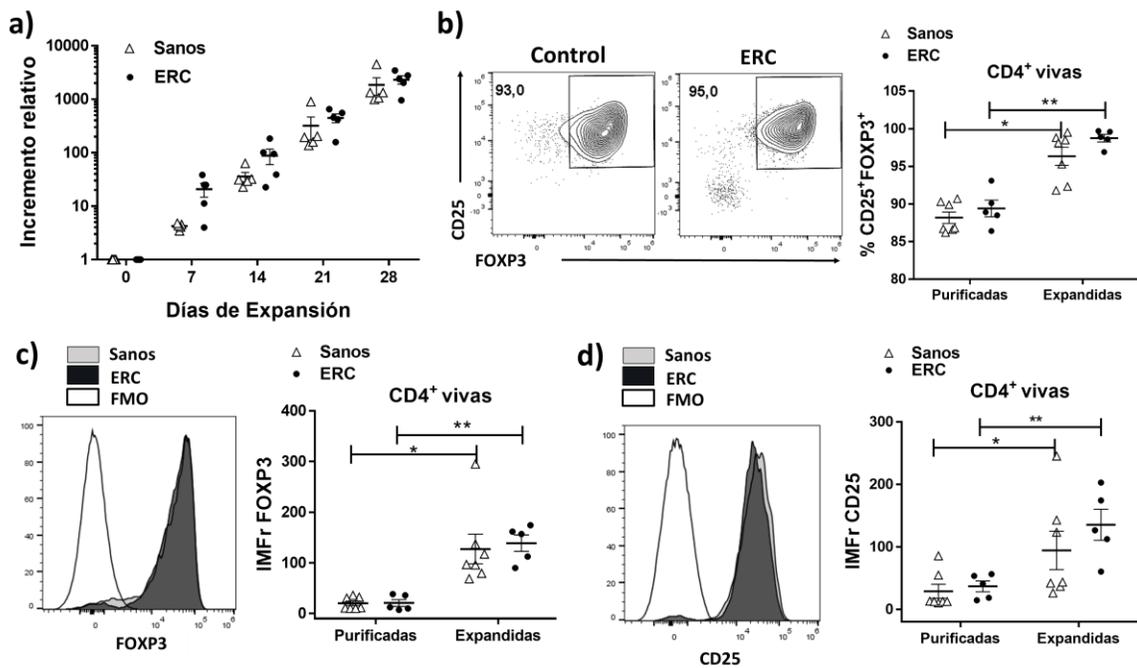
Primero, se evaluó la frecuencia de las células Tregs en sangre de pacientes con ERC. Los pacientes presentaron una proporción de células Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>-</sup> similar al de individuos sanos (Figura 16a). Además, la frecuencia de las células FOXP3<sup>+</sup> dentro de la población CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>-</sup> fue semejante entre ambos grupos de estudio (Figura 16b). Más importante, no se encontró una diferencia significativa en la expresión de los marcadores FOXP3 (Figuras 16c) y CD25 (Figuras 16d) dentro de la población celular CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>-</sup>, respecto al grupo control.



**Figura 16. Pacientes con enfermedad renal crónica tienen una frecuencia normal de células Tregs  $CD4^+CD25^{hi}CD127^-$  en sangre.** Muestras de sangre de los pacientes con enfermedad renal crónica (ERC, círculos relleno negro) o de los individuos sanos (triángulos blancos) fueron marcadas con anticuerpos acoplados a fluorocromos anti-CD4, anti-CD25, anti-FOXP3 y anti-CD127; las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo. a) La proporción de las células Tregs  $CD4^+CD25^{hi}CD127^-$  de los pacientes con ERC fue similar al grupo de los controles sanos. b) Las células T  $CD4^+CD25^{hi}CD127^-$  de los pacientes con ERC tienen un porcentaje de células FOXP3<sup>+</sup> (b), así como la expresión de las proteínas FOXP3 (c) y CD25 (d), similar al grupo control. La IMFr se calculó dividiendo la IMF de la muestra entre la IMF del control FMO. En los incisos a y c se muestran experimentos representativos, y como control se utilizó FMO mostrado en (c) como histograma blanco. La estrategia de análisis se muestra en la Figura C del Anexo II. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba U de Mann-Whitney. Los resultados se presentan como media  $\pm$  EEM.

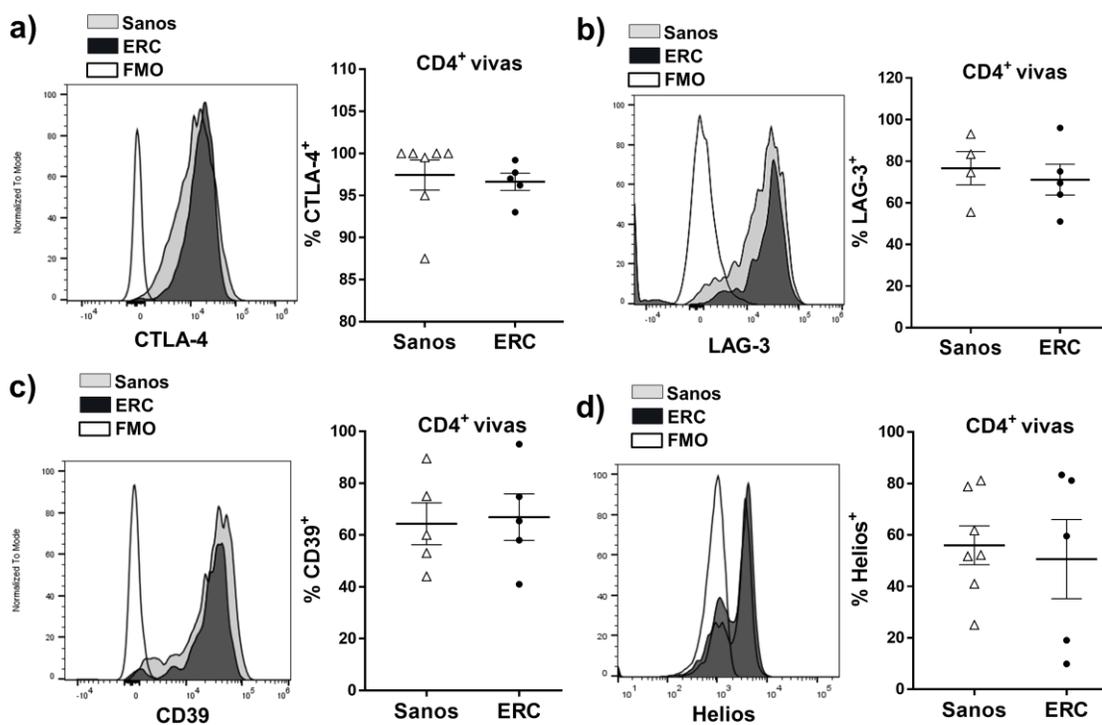
Estudios en modelos animales han sugerido que las células Tregs con especificidad hacia un aloantígeno serían más efectivas para la inducción de la tolerancia al trasplante en comparación con células Tregs policlonales<sup>[236, 245-247, 252, 253]</sup>. En consecuencia, se procedió a evaluar si es posible aislar células Tregs aloantígenos-específicas (<sup>alo</sup>Tregs) de los pacientes con ERC, las cuales sean funcionalmente estables después de una expansión a largo plazo (protocolo Figura 10b). Como se observa en la Figura 17a, después de ser aisladas las <sup>alo</sup>Tregs de los pacientes con ERC tienen una cinética de proliferación similar a las células Tregs de los individuos sanos, llegando a expandirse hasta 2326 veces para las células Tregs de los pacientes y 1851 veces para las células Tregs de los individuos sanos. De manera importante, la proporción de células  $CD25^+FOXP3^+$  incrementa en las <sup>alo</sup>Tregs expandidas a largo plazo respecto al día 0 de purificación, tanto en <sup>alo</sup>Tregs de los pacientes (Figura 17b: ERC

purificadas=  $89.4 \pm 2.5\%$  vs ERC expandidas=  $98.7 \pm 1.1\%$ ,  $p < 0.01$ ), como, en las <sup>alo</sup>Tregs de los controles sanos (Figura 17b: Sanos purificadas=  $88.2 \pm 2.0\%$  vs Sanos Expandidas=  $96.3 \pm 3.2\%$ ,  $p < 0.05$ ). Además, se encontró un incremento de la expresión (IMF) de FOXP3 en las <sup>alo</sup>Tregs expandidas de los pacientes (Figura 17c: purificadas=  $20.8 \pm 15.1$  vs expandidas=  $139.0 \pm 36.0$ ,  $p < 0.01$ ) y de los controles sanos (Figura 17c: purificadas=  $20.3 \pm 11.8$  vs expandidas=  $127.3 \pm 77.5$ ,  $p < 0.05$ ). Asimismo, la expresión del CD25 incrementó en las <sup>alo</sup>Tregs expandidas de ambos grupos de estudio (Figura 17d: Sanos purificadas=  $28.9 \pm 29.7$  vs Sanos expandidas=  $94.3 \pm 80.1$ ,  $p < 0.05$ ; ERC purificadas=  $36.8 \pm 19.4$  vs ERC expandidas=  $135.3 \pm 55.4$ ,  $p < 0.01$ ). Es importante resaltar que, la expresión de las proteínas FOXP3 y CD25 en las <sup>alo</sup>Tregs fue similar entre ambos grupos de estudio (Figura 17c y d).



**Figura 17. Las células Tregs aloespecíficas de los pacientes con ERC incrementan la expresión de los marcadores FOXP3 y CD25 después de la expansión *ex vivo*.** Las células Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>-</sup> (marcadas con CTV) de los individuos sanos (triángulos blancos) o de los pacientes con ERC (círculos negros) fueron estimuladas con CDs alogénicas. En el día 7 se purificaron las Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CTV<sup>-</sup> (aloespecíficas) y se estimularon policlonalmente 4 semanas: al término de la expansión se evaluó la expresión de FOXP3 y CD25 mediante citometría de flujo (Estrategia de análisis: Fig. A del anexo II). a) Las células Tregs aloespecíficas de los pacientes proliferan de manera similar a las células Tregs de los individuos sanos. El incremento relativo se calculó dividiendo el número de células Tregs obtenidas en el día evaluado entre el número de células Tregs del día 0. b-d) Las células Tregs aloespecíficas expandidas de ambos grupos de estudio aumentan la proporción de células CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (b), así como la expresión de los marcadores FOXP3 (c) y CD25 (d) respecto al día de purificación. En los incisos b, c y d se muestran experimentos representativos del día final de expansión, y como control se utilizó FMO representado como histograma blanco en los incisos c y d. La IMF se calculó dividiendo la IMF de la muestra entre la IMF del control FMO. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba U de Mann-Whitney o la prueba de Suma de rangos de Wilcoxon. Los resultados se presentan como media  $\pm$  EEM. Los resultados estadísticamente significativos se indican como \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

Para una mejor caracterización de las células Tregs expandidas, se evaluó la expresión de marcadores asociados a una función inmunosupresora. Las <sup>alo</sup>Tregs de los pacientes con ERC expandidas a largo plazo presentaron un alto porcentaje de células CTLA-4<sup>+</sup> (Figura 18a), LAG-3<sup>+</sup> (Figura 18b), CD39<sup>+</sup> (Figura 18c) y Helios<sup>+</sup> (Figura 18d), similar a las <sup>alo</sup>Tregs de los controles sanos.

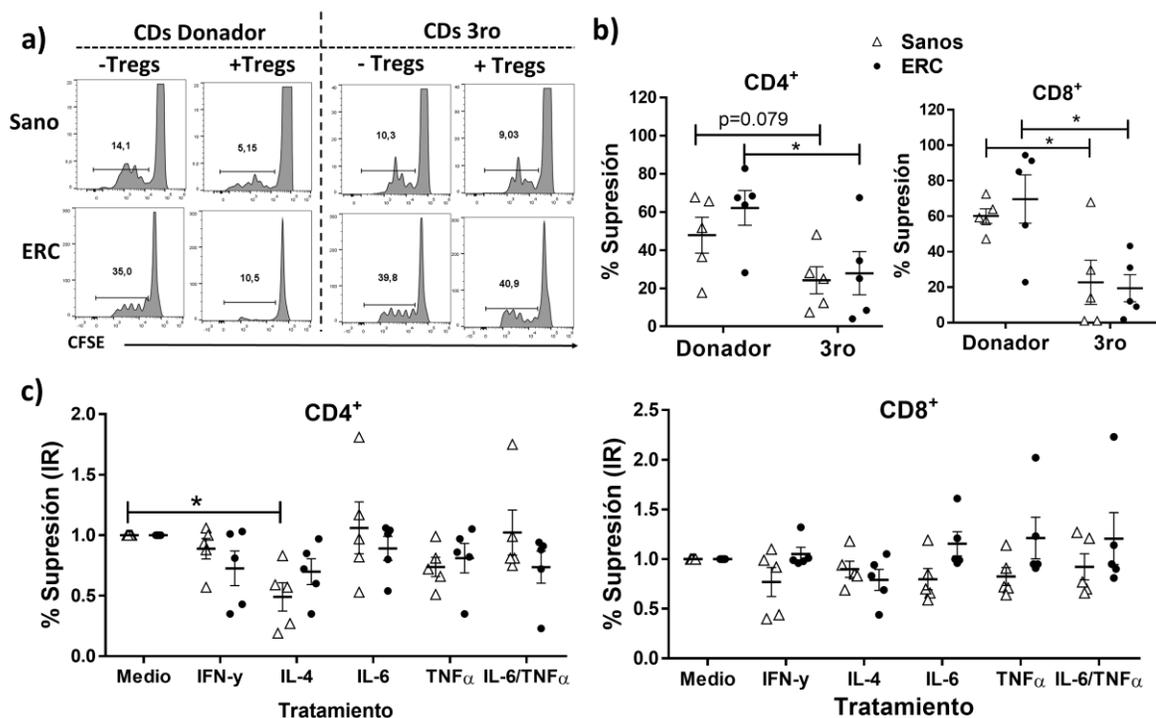


**Figura 18. Las células Tregs aloespecíficas de los pacientes con ERC expandidas tienen una alta expresión de las proteínas CTLA-4, LAG-3 y CD39.** Las células Tregs aloespecíficas de individuos sanos (triángulos blancos) o de pacientes con ERC (círculos negros) fueron expandidas *ex vivo* por 4 semanas y al final se evaluó la expresión de CTLA-4, Helios, LAG-3 y CD39 mediante citometría de flujo (Estrategia de análisis: Fig. A del anexo II). a-d) Las <sup>alo</sup>Tregs de los pacientes tienen una proporción de células CTLA-4<sup>+</sup> (a), LAG-3<sup>+</sup> (b), CD39<sup>+</sup> (c) y Helios<sup>+</sup> (d) similar a las Tregs de los individuos sanos. En los incisos b, c y d se muestran experimentos representativos del día final de expansión, y como control se utilizó FMO representado como histograma blanco. La IMFr se calculó dividiendo la IMF de la muestra entre la IMF del control FMO. Los resultados se presentan como media ± EEM.

### 7.2.2. Las Tregs aloespecíficas expandidas suprimen la proliferación células Tconv de manera antígeno-específica

Posteriormente, se comprobó la capacidad inhibitoria de las células Tregs expandidas en ensayos de MLRs *in vitro*. Para lo anterior, las <sup>alo</sup>Tregs fueron cocultivadas con las células Tconv autólogas y estimuladas con CDs de sus respectivos donadores o CDs de individuos

no relacionados (3ro). En la figura 19a se presentan histogramas representativos de un ensayo de supresión, en los cuales se muestra que las <sup>alo</sup>Tregs expandidas suprimen la proliferación de las células Tconv aloespecíficas sólo cuando son estimuladas con las CDs con las cuales fueron inicialmente expandidas (CDs del donador), pero no suprimen en presencia de CDs de un individuo no relacionado (3ro). Dicha capacidad supresora de las <sup>alo</sup>Tregs de ambos grupos fue significativa para inhibir la proliferación tanto de las células CD4<sup>+</sup> (Figura 19b: Sanos Donador= 47.9 ± 21.0 vs Sanos 3ro= 24.2 ± 15.9 %, p<0.05; ERC Donador= 62.2 ± 20.3 vs ERC 3ro= 27.9 ± 25.3%, p= 0.079) como las CD8<sup>+</sup> (Figura 19b: Sanos Donador= 60.1 ± 9.2 vs Sanos 3ro= 22.7 ± 27.9 %, p<0.05; ERC Donador= 69.7 ± 30.5 vs ERC 3ro= 19.4 ± 17.1 %, p<0.05). Es importante resaltar que las <sup>alo</sup>Tregs de los pacientes suprimen a las células Tconv de manera similar a las células Tregs de los controles (Figura 19b).



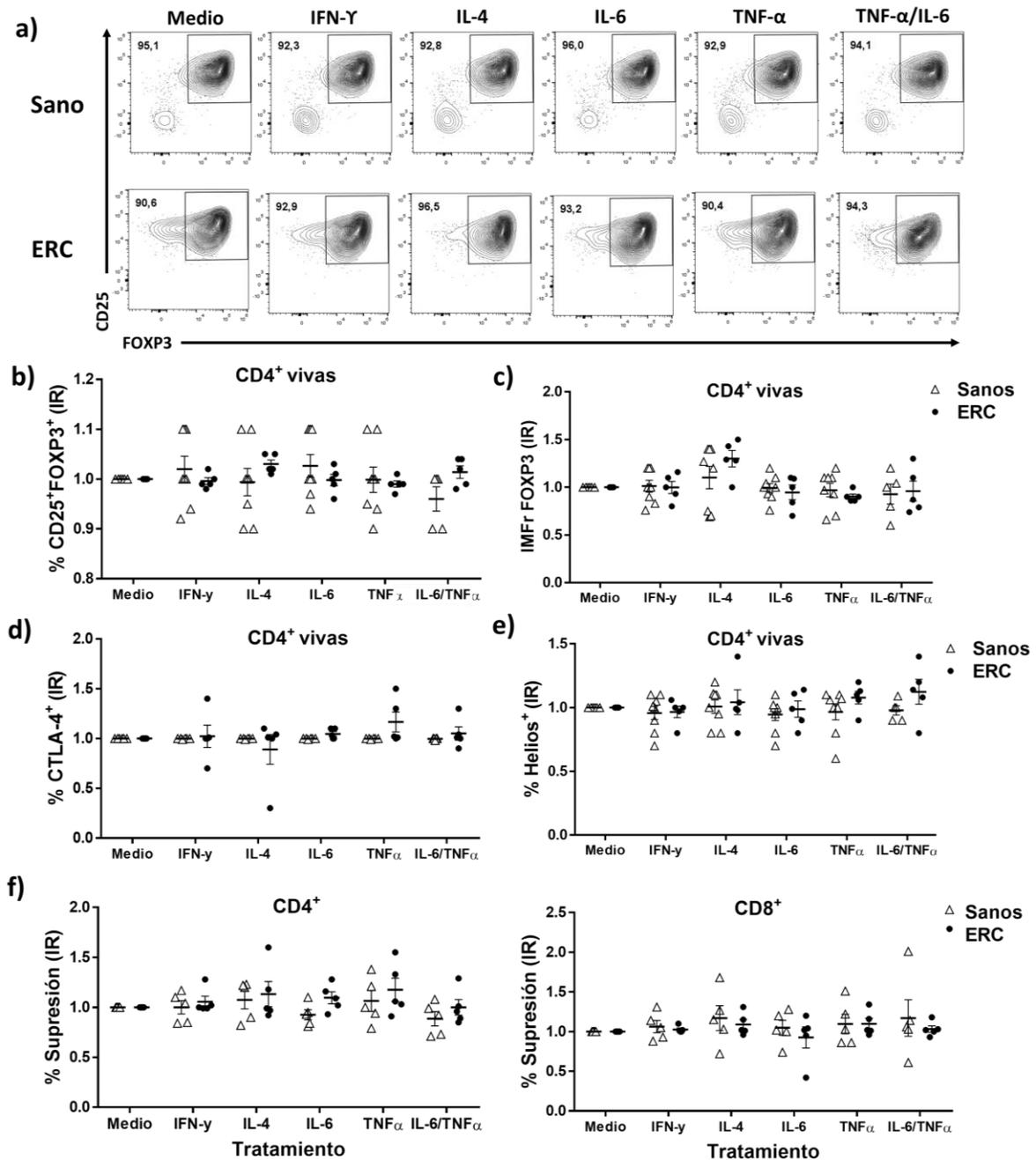
**Figura 19. Las células Tregs aloespecíficas de los pacientes con ERC expandidas *ex vivo* suprimen la proliferación de las células Tconv de manera antígeno-específica.** a) Las células Tregs aloespecíficas de individuos sanos (triángulos blancos) o pacientes con ERC (círculos negros) expandidas fueron cocultivadas con células Tconv marcadas con CFSE y estimuladas con CDs de sus respectivos donadores o individuos no relacionados (3ro). En el día 4, se evaluó la proliferación de células Tconv mediante citometría de flujo (Estrategia de análisis: Fig. D del Anexo II). a) Histogramas representativos de un ensayo, se muestra que las células Tregs suprimen la proliferación de las Tconv solo cuando en presencia de CDs del donador, pero no en presencia de CDs del 3ro. b-c) Las células Tregs aloespecíficas suprimen la proliferación de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (b), aún en presencia de citocinas inflamatorias (c). El incremento relativo (IR) se calculó dividiendo el % de supresión en presencia de la citocina entre el % de supresión en ausencia de citocinas (medio). Los resultados se expresan como media ± EEM. El análisis estadístico se realizó con la prueba U de Mann-Whitney o ANOVA de una vía. Los resultados estadísticamente significativos se indican como \* p <0.05.

Para evaluar la estabilidad funcional de las  $\text{a}^{\text{lo}}$ Tregs expandidas ante un microambiente inflamatorio, se realizaron ensayos de supresión *in vitro* en presencia de citocinas inflamatorias. Las  $\text{a}^{\text{lo}}$ Tregs de los pacientes con ERC y de los individuos sanos presentaron una gran capacidad para inhibir la proliferación de las células T  $\text{CD4}^+$  (Figura 19c, izquierda) y de los  $\text{CD8}^+$  (Figura 19c, derecha) en presencia de todas las citocinas evaluadas (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6 o TNF- $\alpha$ ).

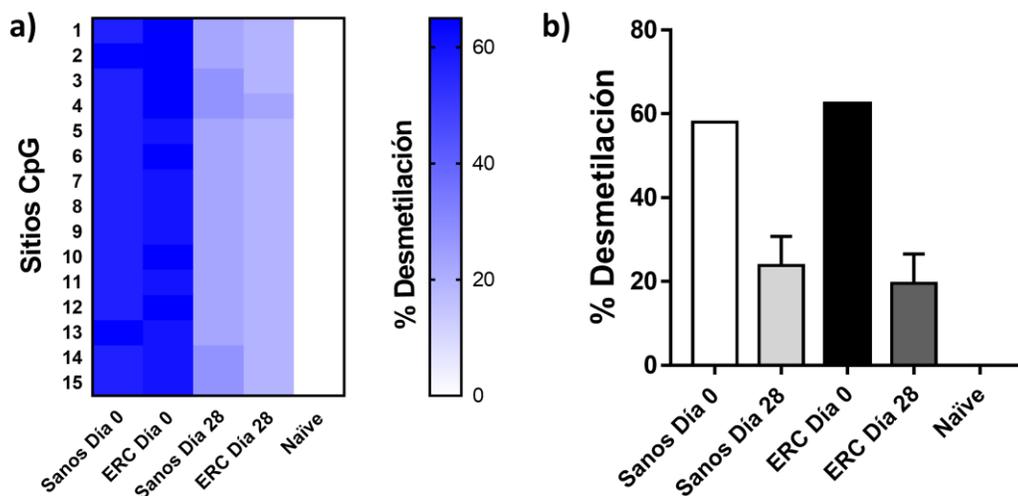
### 7.2.3. Las Tregs aloespecíficas mantienen su fenotipo supresor después de ser estimuladas en un microambiente inflamatorio y ser criopreservadas

Para evaluar la estabilidad en un microambiente inflamatorio desde otro enfoque, las  $\text{a}^{\text{lo}}$ Tregs expandidas fueron estimuladas policlonalmente una semana adicional en presencia de citocinas inflamatorias. Al término del cultivo, se evaluó por citometría de flujo la expresión de marcadores inmunoreguladores, y se realizaron ensayos de supresión *in vitro*. La proporción de las células  $\text{CD25}^+\text{FOXP3}^+$  en las  $\text{a}^{\text{lo}}$ Tregs de los pacientes con ERC se mantuvo en presencia de cada citocina inflamatoria evaluada ((IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$ ), al igual que las  $\text{a}^{\text{lo}}$ Tregs de los controles sanos (Figura 20a y b). Además, la expresión (IMF) de FOXP3 en las células Tregs de ambos grupos de estudio se conservó en todas las condiciones estudiadas (Figura 20c). De manera similar, la estimulación con citocinas inflamatorias no afectó la frecuencia de las células  $\text{CTLA-4}^+$  (Figura 20d) y  $\text{Helios}^+$  (Figura 20e) en las  $\text{a}^{\text{lo}}$ Tregs tanto de los pacientes con ERC, como, de los controles sanos. Adicionalmente, se evaluó si el mantenimiento del fenotipo de las  $\text{a}^{\text{lo}}$ Tregs estimuladas en un microambiente inflamatorio se correlaciona con su función *in vitro*. Los resultados de este trabajo demuestran que las  $\text{a}^{\text{lo}}$ Tregs de los pacientes inhibieron la proliferación de células Tconv  $\text{CD4}^+$  (Figura 20f, izquierda) y  $\text{CD8}^+$  (Figura 20f, derecha) aloespecíficas después de ser estimuladas en presencia de citocinas inflamatorias, y en la misma medida que las  $\text{a}^{\text{lo}}$ Tregs expandidas de los controles sanos.

Para determinar si la estabilidad observada en las  $\text{a}^{\text{lo}}$ Tregs se correlaciona con su estado epigenético, se evaluó la desmetilación de la TSDR de *Foxp3*. De manera inesperada, a pesar de que las  $\text{a}^{\text{lo}}$ Tregs expandidas mostraron un fenotipo y función supresora estable, los resultados preliminares muestran que la expansión *ex vivo* a largo plazo disminuye la desmetilación de los sitios CpG de la TSDR-*Foxp3* en las células  $\text{a}^{\text{lo}}$ Tregs de los pacientes y de los individuos sanos (Figura 21a y b).

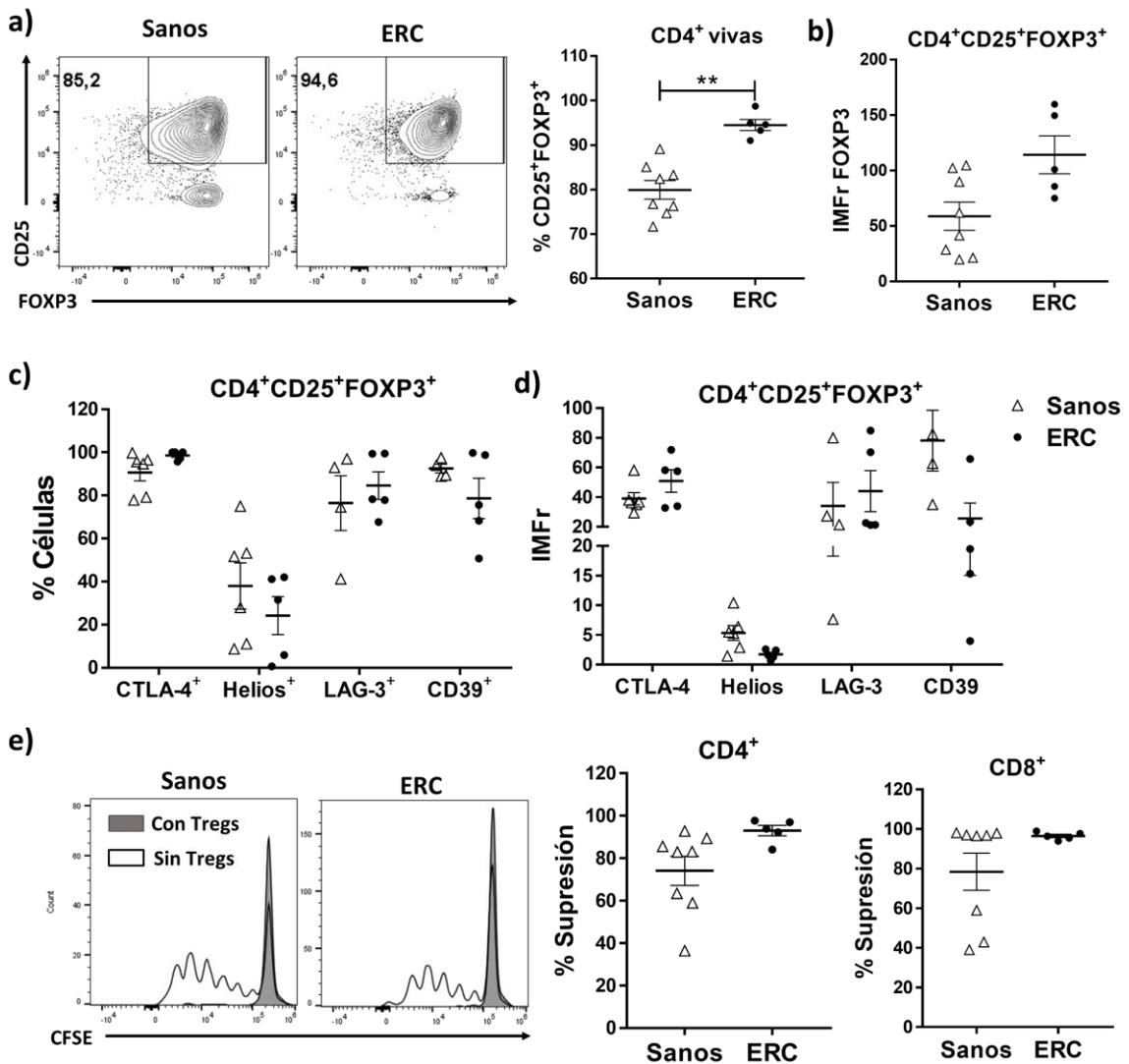


**Figura 20. Células Tregs aloespecíficas mantienen su fenotipo inmunorregulador después de ser estimuladas en un microambiente inflamatorio.** a) Las células Tregs aloespecíficas expandidas se estimularon una semana con anti-CD3/anti-CD28 en presencia o ausencia de citocinas inflamatorias (IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-4 y TNF- $\alpha$ ). a) Se muestra un experimento representativo. b-c) Las células Tregs aloespecíficas de ambos grupos de estudio mantienen el porcentaje de células CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (b), CTLA-4<sup>+</sup> (d) y Helios<sup>+</sup> (e), así como la expresión del FOXP3 (c) después de una expansión en un microambiente inflamatorio. f) Las células Tregs aloespecíficas de ambos grupos de estudio mantienen su capacidad de suprimir la proliferación de las células T CD4<sup>+</sup> (izquierda) y CD8<sup>+</sup> (derecha) después de una expansión en un microambiente inflamatorio. Las estrategias de análisis de citometría de flujo se muestran en las figuras A y B del anexo II). El incremento relativo (IR) del porcentaje de células o de la IMFr se calculó dividiendo el valor en presencia de la citocina evaluada entre el valor en ausencia de citocinas (medio). Los datos se expresan como media  $\pm$  EEM.



**Figura 21. La expansión *ex vivo* a largo plazo disminuye la desmetilación de la TSDR en las células Tregs aloespecíficas de pacientes con ERC.** a) Cada fila representa un sitio de CpG analizado, y el código de color de la metilación varía de blanco (0% de desmetilación) a azul (100% de desmetilación) según la escala de colores. Las células T naive muestran una TSDR completamente metilado y se usaron como control negativo. b) Datos preliminares muestran que el porcentaje desmetilación de la TSDR de *Foxp3* disminuyó en las células Tregs aloespecíficas expandidas de pacientes e individuos sanos. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM.

Finalmente, se evaluó el efecto de la criopreservación sobre la expresión de marcadores típicos de células Tregs y la capacidad inhibitoria de las <sup>alo</sup>Tregs expandidas. Para dicho propósito, las <sup>alo</sup>Tregs expandidas fueron criopreservadas por un largo periodo (> seis meses) y después de ser descongeladas, se realizó una segunda expansión policlonal durante dos semanas. De manera interesante, al final de la segunda expansión, las células <sup>alo</sup>Tregs de los pacientes con ERC presentaron un incremento tanto del porcentaje de células CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (Figura 22a: Sanos= 79.9  $\pm$  5.9%, ERC= 94.5  $\pm$  2.8%; p<0.01), como, la expresión del FOXP3 (Figura 22b: Sanos= 58.8  $\pm$  36.0 vs ERC= 114.3  $\pm$  38.2; p=0.093), en comparación con las células Tregs de los controles sanos. En contraste, la expresión (IMF) y el porcentaje de células positivas para las biomoléculas CTLA-4, Helios, LAG-3 y CD39 fue similar en las <sup>alo</sup>Tregs de ambos grupos (Figura 22c y d). Finalmente, para evaluar la funcionalidad de las <sup>alo</sup>Tregs criopreservadas, se realizaron ensayos de supresión *in vitro*. Las <sup>alo</sup>Tregs de los pacientes con ERC expandidas tienen la capacidad de suprimir la proliferación de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> después de ser criopreservadas, comparable a las células Tregs de los controles sanos (Figura 22e).



**Figura 22. Las células Tregs aloespecíficas de pacientes con ERC son fenotípicamente estables después de una criopreservación a largo plazo.** Las células Tregs aloespecíficas expandidas fueron criopreservadas > seis meses; posteriormente, las células descongeladas se expandieron policlonalmente dos semanas y al final se evaluó el fenotipo de las células mediante citometría de flujo (a-d) y ensayos de supresión *in vitro* policlonales (e). a,b) Las <sup>alo</sup>Tregs de los pacientes con ERC tienen una mayor frecuencia de células CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, en comparación con las células Tregs de individuos sanos al término de la segunda expansión (a); aunque no hubo diferencia en la expresión de FOXP3 (b). c,d) El porcentaje de células (c) y expresión (d) de las proteínas CTLA-4, Helios, LAG-3 y CD39 fue similar en las células Tregs criopreservadas de ambos grupos de estudios después de ser expandidas. e) Las células Tregs aloespecíficas mantienen la capacidad de suprimir la proliferación de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> después de ser criopreservadas. En los incisos a y e se muestran experimentos representativos del día final de expansión. Las estrategias de análisis de citometría de flujo se muestran en las Figuras A y B del anexo II. La IMFr se calculó dividiendo la IMF de la muestra entre la IMF del control FMO. Los resultados se presentan como media ± EEM. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba U de Mann-Whitney. Los resultados estadísticamente significativos se indican como \*\* p<0.01.

## 8. DISCUSIÓN

La inmunoterapia basada en la transferencia adoptiva de células Tregs ha demostrado ser eficaz en estudios preclínicos para inducir la aceptación de órganos sólidos trasplantados<sup>[223-226, 233-249]</sup> y para prevenir el desarrollo de la EICH<sup>[227-230, 238, 250, 251]</sup>. En humanos, recientemente se ha utilizado la terapia adoptiva de células Tregs en pacientes con TCTH para prevenir o tratar los síntomas de la EICH. Estos trabajos han demostrado que el tratamiento es factible, seguro y potencialmente eficaz<sup>[291-297]</sup>. Sin embargo, los ensayos clínicos en pacientes con trasplante de riñón aún son limitados<sup>[300-302]</sup> y la mayoría de los estudios aún se encuentran en curso<sup>[220, 222, 307]</sup>.

Una de principales limitantes para la aplicación clínica de células Tregs en humanos ha sido el número limitado de estas células disponibles, ya que representan menos del 10% de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en sangre. Derivado de esto, varias investigaciones se han enfocado en diseñar protocolos para aislar, expandir y preservar células Tregs con el objetivo de obtener los números celulares necesarios para una inmunoterapia eficaz. Sin embargo, la mayoría de estos protocolos han sido usando células Tregs provenientes de individuos sanos. Por consiguiente, en el presente trabajo evaluamos si es factible expandir las células Tregs de dos grupos de pacientes que serían candidatos a la inmunoterapia con Tregs: el primero, a partir de pacientes que ya han recibido un trasplante renal, pero han sido mantenidos varios años bajo un régimen inmunosupresor; el segundo, a partir de pacientes con ERC candidatos a trasplante.

Un estudio reciente mostró que es posible el aislamiento y la expansión policlonal de las células Tregs provenientes de receptores renales sometidos a inmunosupresión durante seis meses<sup>[300]</sup>. En este contexto, en un trabajo realizado previamente en el laboratorio se reportó que las células Tregs de receptores renales tratados con belatacept, un bloqueador específico de la coestimulación, a largo plazo (6 a 8 años) tienen una hipermetilación de citosinas de la TSDR-*Foxp3*, lo cual se asoció con disminución tanto de su expresión del FOXP3, como, su función supresora *in vitro*<sup>[272]</sup>. Sin embargo, actualmente se desconoce si es factible expandir *ex vivo* las células Tregs de pacientes trasplantados bajo terapia inmunosupresora a largo plazo (> 6 meses) para obtener Tregs funcionalmente estables que puedan ser usadas en inmunoterapia. En este aspecto, un estudio reportó que la estimulación *in vitro* con IL-2 puede restaurar la viabilidad de células Tregs de los receptores de hígado tratados con

inhibidores de calcineurina<sup>[308]</sup>. Asimismo, las células Tregs de los pacientes con distintas inmunopatologías mostraron una mayor capacidad supresora *in vitro* después de ser expandidas, en comparación con las células Tregs recién purificadas de los mismos pacientes<sup>[309]</sup>. Basado en lo anterior, hipotetizamos que la alteración funcional de las células Tregs de los pacientes tratados con BLT podría ser resultado de la exposición prolongada a un ambiente alterado de citocinas y/o una señalización defectuosa causado por el bloqueo de la coestimulación, lo cual podría ser revertido con una estimulación *ex vivo*.

Los protocolos de expansión *ex vivo* de células Tregs consisten en una estimulación inicial con anti-CD3/anti-CD28 (policlonal) o con células presentadoras de antígeno (antígeno-específicas) en presencia de IL-2<sup>[220]</sup>. Sin embargo, se ha demostrado que la estimulación crónica del TCR en células Tregs puede causar una disminución de los niveles del FOXP3 y de su capacidad supresora<sup>[310]</sup>. Los protocolos experimentales usados en este trabajo (Figura 10) fueron diseñados para minimizar la estimulación crónica de las células Tregs y para mantener la expresión del FOXP3 mediante la adición de rapamicina (un inhibidor de la vía PI3K/Akt/mTOR), como han reportado trabajos previos<sup>[262-266]</sup>. Notablemente, las células Tregs de los pacientes tratados con BLT pueden ser expandidas policlonalmente de manera eficiente en presencia de rapamicina (<sup>poli</sup>Tregs), similar a las células Tregs de los controles sanos. Estos resultados indican que a pesar de las alteraciones reportadas en las células Tregs de pacientes sometidos a terapia inmunosupresora a largo plazo, estas mismas células no tienen un defecto intrínseco en su capacidad de proliferación. De manera importante, las <sup>poli</sup>Tregs de los pacientes Tx-BLT mostraron características similares a las células Tregs de los controles sanos, incluyendo el aumento de los niveles de FOXP3, CTLA-4 y CD25. Uno de los mecanismos moleculares mediados por la rapamicina durante la expansión de las células Tregs incluye el aumento en la expresión de Pim-2, una serina-treonina cinasa involucrada en la proliferación y la supervivencia celular, lo cual confiere una ventaja proliferativa a las células Tregs sobre las Tconv<sup>[261]</sup>. Además, la rapamicina incrementa la expresión de PTEN<sup>[265]</sup>, una fosfatasa que inhibe la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR, la cual es importante para mantener la función inmunoreguladora de las células Tregs<sup>[68]</sup>. La inhibición de la vía PI3K/Akt/mTOR permite la translocación nuclear de las proteínas FoxO1 y FoxO3, las cuales se unen al locus *de Foxp3* y cooperan para regular positivamente la expresión de FOXP3<sup>[69, 70]</sup>.

Asimismo, se demostró que es posible aislar y expandir las células Tregs de pacientes con ERC con aloespecificidad directa. De manera importante, con el protocolo diseñado en el presente trabajo se obtuvieron células Tregs aloespecíficas con una alta pureza (mayor al 95%) determinado como la frecuencia de células CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, así como, un incremento de la expresión (IMF) de las proteínas FOXP3 y CD25, los cuales son requeridos para su función supresora. El fenotipo mencionado anteriormente puede deberse a un efecto de la adición de rapamicina, la cual, como se mencionó anteriormente, permite el crecimiento preferencial de las células Tregs y el mantenimiento de los niveles del FOXP3<sup>[261-266]</sup>, y de TGF-β, el cual se ha relacionado con la estabilización a nivel epigenético de la expresión del FOXP3 mediante la inhibición del reclutamiento de metilasas de ADN en el *Foxp3*<sup>[311]</sup>.

El análisis fenotípico mostró que las <sup>poli</sup>Tregs de los pacientes Tx-BLT y las <sup>alo</sup>Tregs de los pacientes con ERC tuvieron un incremento en la expresión de los marcadores CD25 y de CTLA-4, que se correlaciona con el aumento de los niveles del FOXP3, el cual regula directamente la transcripción de ambas proteínas mediante la unión a sus genes *Il2ra* y *Ctla4*<sup>[312]</sup>. Esto es funcionalmente relevante, ya que, la expresión del CTLA-4 en las células Tregs es fundamental para inhibir la función de las CPAs y de esta forma suprimir la proliferación de las células Tconv aloespecíficas<sup>[163, 313]</sup>. La interacción del CTLA-4 con sus ligandos CD80/CD86 en las CDs induce la expresión deIDO (indolamina 2,3-dioxigenasa), una enzima que favorece el catabolismo del triptófano hacia quinurenina, un metabolito tóxico para las células Tconv<sup>[121]</sup>. Además, se ha demostrado que a través del CTLA-4, las células Tregs pueden capturar y degradar las moléculas CD80/CD86 expresado en las CPAs mediante un proceso de trans-endocitosis, y lo que da como resultado una coestimulación deficiente en las células T a través del CD28<sup>[122]</sup>. Consistente con estos conceptos, la deficiencia específica del CTLA-4 en las células Tregs reduce su capacidad supresora *in vitro* e *in vivo*, favoreciendo el desarrollo de una enfermedad fatal autoinmune caracterizada por una hiperproducción de autoanticuerpos y una linfoproliferación exacerbada<sup>[313]</sup>. En el contexto de trasplante, utilizando diversos enfoques en modelos animales se ha establecido que la señalización por CTLA-4 participa en la inducción temprana de aceptación al aloinjerto, al inhibir la activación y la proliferación de las células Tconv <sup>[156-167, 314, 315]</sup>.

La expresión del CD25, cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2, es esencial para promover la homeostasis y la función supresora de las células Tregs<sup>[64]</sup>. La unión de IL-2 al CD25 activa la fosforilación del STAT5, un factor de transcripción que se une a la CNS2 en el locus de *Foxp3* e induce la expresión del FOXP3<sup>[60, 73, 81]</sup>. Además, la unión del STAT5 a la CNS2 favorece el reclutamiento de la TET2, una metilcitosina dioxigenasa que cataliza la desmetilación de citosinas, a la CNS2 mantiene los sitios CpG en *Foxp3* desmetilados<sup>[316, 317]</sup>. Notablemente, cuando existe cantidad limitada de IL-2, las serina/treonina cinasas Mst1 y Mst2 (altamente expresadas en células Tregs) detectan señales de IL-2 para promover la activación de STAT5 y, de esta manera, mantener la homeostasis de las células Treg, la estabilidad del linaje y su capacidad supresora<sup>[318]</sup>. Asimismo, los altos niveles del CD25 en las células Tregs favorece el consumo de la IL-2 del microambiente; mediante este mecanismo pueden disminuir la proliferación y la supervivencia de las células Tconv<sup>[115, 116]</sup>.

Adicionalmente, las células Tregs expandidas de ambos grupos de pacientes mantuvieron la expresión del Helios, un miembro de la familia de factores de transcripción Ikaros, el cual es expresado por algunas subpoblaciones de células Tregs<sup>[319]</sup>. Estudios previos han descrito que la expresión de Helios es necesaria en las células Tregs para regular la transcripción de genes inmunomoduladores (*Gitr, Cd25, Lag3, Cd39, Cd73, Cd103, Tfgb, Il10*)<sup>[320, 321]</sup>, promover la supervivencia<sup>[304]</sup> y mantener su fenotipo estable durante una respuesta inflamatoria<sup>[322]</sup>. Asimismo, el aumento de las células Tregs Helios<sup>+</sup> se ha correlacionado con un buen pronóstico de aceptación del aloinjerto en humanos<sup>[323, 324]</sup>. De manera interesante, un trabajo reciente ha descrito que la expansión *ex vivo* de células Tregs de pacientes diabéticos mantienen su capacidad supresora a pesar de una reducción de la expresión de Helios<sup>[325]</sup>, lo que sugiere que este marcador podría no definir necesariamente un estado funcional de las células Tregs.

Interesantemente, las células Tregs de los pacientes Tx-BLT expandidas mostraron una alta expresión del CCR7, un receptor de quimiocinas que participa en la migración de las células Tconv y de las células Tregs a los ganglios linfáticos, contribuyendo tanto a la respuesta inmune contra patógenos como en la tolerancia<sup>[305]</sup>. La expresión del CCR7 en las células Tregs está regulada por FoxO1, el cual se une directamente al locus de *Ccr7*<sup>[326]</sup>. Por lo tanto, la expresión constitutiva de PTEN en las células Tregs<sup>[68]</sup> y la adición de rapamicina en los

cultivos, podrían favorecer la transcripción del gen *Ccr7* en las Tregs expandidas al inhibir la vía PI3K/Akt/mTOR y permitir la traslocación del FoxO1 al núcleo<sup>[69, 70, 265]</sup>. Los resultados obtenidos en los modelos animales sugieren que el CCR7 desempeña un papel fundamental en la inducción de tolerancia al aloinjerto, mediante la regulación de la migración y el posicionamiento de las células Tregs en nichos funcionales definidos dentro de los ganglios linfáticos durante la respuesta inmune al trasplante<sup>[327-330]</sup>.

Por otra parte, un análisis más profundo del fenotipo de las células Tregs aloespecíficas de pacientes con ERC reveló que tienen una alta expresión de las proteínas LAG-3 y CD39. LAG-3, un miembro de la familia de CD4 altamente expresado en las células Tregs, interactúa con las moléculas del MHC-II con una alta afinidad e induce una vía de señalización inhibitoria que tiene como resultado final la inhibición de la maduración y la capacidad presentadora de antígenos en las CD4<sup>[127-129]</sup>. Además, LAG-3 es esencial para la máxima supresión de las células Tregs, ya que el bloqueo de LAG-3 en las células Tregs anula su función supresora *in vitro* e *in vivo*<sup>[128]</sup>. Es de destacar que las células Tregs pueden adquirir moléculas MHC-II a través de trogocitosis<sup>[130]</sup> y se había demostrado que células Tregs MHC II<sup>+</sup> son más supresoras que células Tregs MHC II<sup>-</sup><sup>[331]</sup>. En el contexto de trasplante, el aumento de la expresión de LAG-3 en las células Tregs contribuye a prolongar la supervivencia de aloinjertos modulando la producción de citocinas inflamatorias (IL-21 e IL-17) en las células Tconv y la función de las CD4<sup>[130, 170, 171]</sup>.

Por otro lado, la expresión del CD39 en las células Tregs es importante para generar adenosina pericelular, la cual, inhibe las funciones de las células Tconv a través de la activación del receptor A<sub>2A</sub>R, lo cual aumenta la cAMP intracelular<sup>[117-119, 332]</sup>. En las células Tconv, el cAMP inhiben la señalización mediada por el TCR teniendo como resultado la disminución de la proliferación y de la producción de citocinas inflamatorias<sup>[119]</sup>. En las CD4, el cAMP disminuye la expresión de moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD86, y CD83) y aumentan la expresión de moléculas coinhibidoras (B7-H1, B7-H3 y B7-DC)<sup>[119]</sup>. Además, la adenosina reduce el reclutamiento de leucocitos, la adhesión al endotelio, la fagocitosis, la producción de ROS y reduce la secreción de TNF- $\alpha$  e IL-6<sup>[120]</sup>. Adicionalmente, los niveles del CD39 ha sido asociado en el control de la inflamación durante la respuesta inmune contra el órgano trasplantado<sup>[150-152, 154, 155, 333, 334]</sup>.

Anteriormente, nuestro grupo de investigación demostró que las células Tregs de receptores renales tratados con BLT a largo plazo presentaron una reducción de su función supresora *in vitro* en comparación con células Tregs de individuos sanos<sup>[272]</sup>. De manera importante, las células Tregs de los pacientes Tx-BLT expandidas en presencia de rapamicina mostraron una gran capacidad supresora *in vitro* de manera similar a células Tregs de controles sanos, lo cual concuerda con el aumento de la expresión de moléculas relacionadas con una función inmunorreguladora, como, FOXP3, CD25 y CTLA-4. Estos resultados podrían sugerir que la función alterada de las células Tregs de sangre de pacientes Tx-BLT a largo plazo podría deberse a una señalización defectuosa dependiente del CD28, como resultado del bloqueo de la coestimulación. De hecho, se ha reportado que la cola citoplasmática del CD28 contiene motivos de unión a Lck importantes en la diferenciación y función de las células Tregs al promover la expresión de los marcadores FOXP3 y CTLA-4<sup>[65-67]</sup>. Además, la señalización a través del CD28 es crucial para una óptima función *in vivo* de las células Tregs, ya que, la eliminación específica de *Cd28* en células FOXP3<sup>+</sup> desencadenó una grave autoinmunidad como consecuencia de alteraciones en la proliferación y la supervivencia de las células Tregs, así como, una disminución de los niveles de proteínas CTLA-4 y PD-1<sup>[335]</sup>.

De manera importante, en este trabajo demostramos que las células Tregs aloespecíficas de pacientes con ERC aisladas y expandidas suprimen la proliferación de células Tconv de manera antígeno-específica, que se correlaciona con el incremento de moléculas asociadas con una función inmunosupresora incluyendo FOXP3, CTLA-4, LAG-3 y CD39. Lo anterior toma importancia, ya que, las terapias actuales para prevenir el rechazo del órgano trasplantado incluyen el uso de fármacos inmunosupresores, los cuales no suprimen la función de las células Tconv aloespecíficas de manera específica y esto se ha asociado con efectos adversos en los pacientes a largo plazo<sup>[54]</sup>. En este contexto, estudios preclínicos han demostrado que la transferencia adoptiva de células Tregs con aloespecificidad directa inducen tolerancia al injerto por sí solas<sup>[233]</sup> o en sinergia con periodos cortos de tratamientos inmunosupresores<sup>[241, 244, 247]</sup>. Incluso se ha destacado el potencial de células Tregs humanas con aloespecificidad directa utilizando un modelo de ratón humanizado<sup>[252, 253]</sup>. En ambos estudios, las células Tregs aloespecíficas fueron más eficaces para proteger xenoinjertos de piel en comparación con Tregs policlonales<sup>[252, 253]</sup>. Alternativamente, las células Tregs con aloespecificidad directa podrían crear un entorno tolerogénico en el órgano trasplantado para promover el desarrollo de células Tregs con especificidad indirectas, logrando así la tolerancia a largo plazo<sup>[221]</sup>.

Bajo ciertos escenarios inflamatorios, se ha reportado que algunas poblaciones de células Tregs pueden perder la expresión del FOXP3 y por tanto, su capacidad supresora<sup>[336]</sup>. En consecuencia, es crucial evaluar la estabilidad funcional de las células Tregs con fines terapéuticos. Nuestros resultados mostraron que las <sup>poli</sup>Tregs de los pacientes Tx-BLT y de los <sup>alo</sup>Tregs de pacientes con ERC inhibieron la proliferación de células Tconv CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en presencia de citocinas inflamatorias (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-4 e IFN- $\gamma$ ). Más importante, las <sup>alo</sup>Tregs de los pacientes con ERC mantuvieron su expresión de marcadores inmunorreguladores (FOXP3, CD25 y CTLA-4) y su capacidad reguladora después de ser estimuladas en presencia del microambiente inflamatorio. Sin embargo, cuando las <sup>poli</sup>Tregs de los pacientes Tx-BLT se expandieron en presencia de las citocinas antes mencionadas, los niveles de FOXP3 disminuyeron en las células Tregs cultivadas con IL-6 y TNF- $\alpha$ . Investigaciones previas muestran que las citocinas IL-6<sup>[258]</sup> y TNF- $\alpha$ <sup>[259]</sup> pueden desencadenar la degradación del FOXP3. Estos datos podrían indicar que células Tregs de los pacientes Tx-BLT serían menos estables en condiciones proinflamatorias, lo cual también podría ser debido a diferencias en el estado epigenético del gen *Foxp3*.

Se ha demostrado que la estabilidad de la expresión del FOXP3 se correlaciona con la desmetilación completa de la TSDR dentro del locus de *Foxp3*<sup>[73, 80, 81]</sup>. Como se reportó anteriormente, las células Tregs de los pacientes Tx-BLT a largo plazo muestran un aumento de la metilación de la TSDR de *Foxp3*<sup>[272]</sup>. Esto concuerda con un modelo preclínico, en el cual hubo un hipermetilación de la TSDR en biopsias renales de individuos tratados con BLT<sup>[337]</sup>. Cuando analizamos el estado de metilación de la TSDR de *Foxp3* en las células Tregs expandidas, encontramos que las <sup>poli</sup>Tregs de los pacientes tratados con BLT mantenía una menor desmetilación de la TSDR en comparación con las células Tregs de los individuos sanos, lo cual podría ser correlacionado con la susceptibilidad de las Tregs de los pacientes Tx-BLT a la pérdida del FOXP3 en un microambiente inflamatorio. De manera similar, la expansión a largo plazo disminuyó el porcentaje de desmetilación en la TSDR-*Foxp3*, tanto en las <sup>alo</sup>Tregs de pacientes con ERC, como, en las Tregs de los individuos sanos. Interesantemente, los porcentajes de desmetilación al final de la expansión fueron similares entre las células Tregs de los pacientes Tx-BLT (Figura 15) y de los pacientes con ERC (Figura 21), pero las Tregs de estos últimos fueron más estables ante un microambiente inflamatorio. Estos datos sugieren que el aumento de la expresión FOXP3 y la fuerte actividad supresora de las células Tregs expandidas no se correlacionaron con en el estado

epigenético del locus de *Foxp3*, lo que sugiere que, otros mecanismos moleculares podrían explicar la funcionalidad de estas células. En este contexto, se ha reportado que la hipometilación de citosinas y la adquisición del linaje Treg son independientes de la expresión del FOXP3<sup>[338]</sup>. Además, no se puede descartar que otros mecanismos participen en la identidad y/o en la estabilidad de las células Tregs, como las modificaciones de histonas (metilación, acetilación), el posicionamiento de nucleosoma y la regulación mediada por miRNAs, así como, modificaciones postraduccionales de FOXP3 (fosforilación, acetilación, ubiquitinación)<sup>[60, 74-76]</sup>.

La criopreservación de las células Tregs ha sido propuesta como una herramienta terapéutica complementaria, ya que, ofrece varias ventajas incluyendo el almacenamiento de las Tregs a largo plazo, la flexibilidad del tiempo de infusión y, además, evita la activación crónica de las células Tregs que podría llevarlas a un estado de agotamiento celular<sup>[220]</sup>. Sin embargo, el conocimiento acerca de cómo el proceso de criopreservación puede afectar la estabilidad de las células Tregs aún es limitado. Se han publicado informes controversiales sobre si la criopreservación reduce la frecuencia de células Tregs FOXP3<sup>+</sup> en sangre: algunos trabajos reportan una frecuencia de Tregs disminuidas<sup>[339, 340]</sup>, mientras que otros no reportan diferencias significativas<sup>[341]</sup>. Nuestros resultados (datos no mostrados) y estudios previos<sup>[342, 343]</sup> han demostrado que la expresión de los marcadores CD25 y FOXP3 en células Tregs, así como su función supresora, puede verse afectadas inmediatamente después del descongelación. En el presente trabajo demostramos que se pueden obtener células Tregs aloespecíficas funcionales después de ser descongeladas y reactivadas, lo cual coincide con trabajos previamente publicados<sup>[342, 343]</sup>. Estos resultados sugieren que sería factible utilizar Tregs expandidas después de ser criopreservadas.

En resumen, evidenciamos que las células Tregs de los pacientes tratados con BLT, expandidas *ex vivo* en presencia de rapamicina, son capaces de restaurar su expresión del FOXP3 y su función supresora *in vitro*, sin embargo, la estabilidad del FOXP3 puede verse afectada en un microambiente proinflamatorio. Adicionalmente, demostramos que es posible expandir células Tregs aloespecíficas de pacientes con ERC candidatos a trasplante renal, para obtener células funcionalmente estables y con un potencial terapéutico.

## 9. CONCLUSIONES

1. Las células Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> de los receptores renales tratados con belatacept presentan un aumento de la expresión de marcadores inmunoreguladores (FOXP3, CD25, CTLA-4 y CCR7) después de ser expandidas *ex vivo* policlonalmente en presencia de rapamicina, de manera comparable a las células Tregs de los individuos sanos.
2. Las células Tregs de los pacientes Tx-BLT expandidas tienen una alta capacidad de suprimir la proliferación de las células Tconv, aún en presencia de citocinas inflamatorias, y de manera similar a las células Tregs de los controles sanos.
3. Las células Tregs de los pacientes Tx-BLT expandidas tienen una disminución de la expresión del FOXP3 después de ser estimuladas en presencia de IL-6 y TNF- $\alpha$ .
4. Las células Tregs de los pacientes Tx-BLT expandidas presentan una menor desmetilación de citosinas de la TSDR en el locus de *Foxp3*, comparadas con las células Tregs de los controles sanos.
5. Las células Tregs de los pacientes con ERC aloespecíficas expandidas tienen una alta expresión de las proteínas FOXP3, CD25, LAG-3, CTLA-4 y CD39, similar a las células Tregs de los individuos sanos.
6. Las células Tregs aloespecíficas de los pacientes con ERC tienen la capacidad de suprimir la proliferación de células Tconv de manera antígeno-específica, aún en presencia de citocinas inflamatorias.
7. Las células Tregs aloespecíficas de los pacientes con ERC mantienen su fenotipo inmunosupresor después de ser activadas en presencia de citocinas inflamatorias y ser criopreservadas.
8. Datos preliminares muestran que las células Tregs aloespecíficas de los pacientes con ERC e individuos sanos disminuyen la desmetilación de la TSDR-*Foxp3* después de ser expandidas a largo plazo.

## 10. PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir de los resultados y las discusiones presentados en la presente tesis doctoral, proponemos dos enfoques, no mutuamente excluyentes, para garantizar la estabilidad funcional *in vivo* de las células Tregs en pacientes con trasplante renal.

En primer lugar, planteamos que agentes modificadores de la cromatina deberían ser incluidos en el protocolo de expansión de células Tregs con un fenotipo alterado, como en las Tregs de los pacientes tratados con BLT que tienen una hipermetilación de la TSDR-*Foxp3*<sup>[272]</sup>, para que puedan consideradas como una alternativa inmunoterapéutica. En este contexto, las células Tregs de pacientes con artritis reumatoide mostraron una función supresora defectuosa que pudo ser restaurada después del tratamiento *in vitro* con metotrexato, como resultado del incremento en la desmetilación de la TSDR y, en consecuencia, aumento de la expresión del FOXP3<sup>[344]</sup>. Asimismo, el estimulación *in vitro* de células T CD4<sup>+</sup> de humanos<sup>[345, 346]</sup> y de ratón<sup>[347]</sup> en presencia de azacitidina, un inhibidor de metiltransferasas de ADN, promueve la expresión del FOXP3 debido al incremento de la desmetilación de citosinas en el locus de *Foxp3*. Estos resultados son consistes con ensayos clínicos fase 1/2, en los cuales se han demostrado que el tratamiento con azacitidina<sup>[348, 349]</sup> o con metotrexato<sup>[350, 351]</sup> incrementan la frecuencia de células Tregs FOXP3<sup>+</sup> en sangre de pacientes con distintas inmunopatologías. Adicionalmente, hallazgos recientes han demostrado que mediante distintas estrategias es posible modificar el estado epigenético en las células Tregs generadas *in vitro* (iTregs), las cuales inicialmente presentan una completa metilación citosinas de la TSDR-*Foxp3*<sup>[73]</sup>. Por ejemplo, la estimulación de células T CD4<sup>+</sup> vírgenes mediante TCR/IL-2/TGF- $\beta$  junto con la inhibición de señales coestimuladoras de CD28<sup>[352]</sup>, la adición de ácido retinoico<sup>[353]</sup> o de vitamina C<sup>[354-356]</sup> (un co-activador de la metilcitosina-dioxigenasa TET la cual controla la estabilidad del FOXP3<sup>[77]</sup>), incrementan la desmetilación en la CNS2 de *Foxp3* y otras TSDRs (*Gitr*, *Ctla4*, *Ikzf2*, *Ikzf4*)<sup>[352-356]</sup>, incluso en células T CD4<sup>+</sup> de memoria<sup>[352]</sup>. Interesantemente, un estudio ha demostrado que la combinación de tres modificadores de la cromatina, butirato de sodio (un inhibidor de las acetilasas de histonas), UNC0646 (un inhibidor de las metiltransferasas de histonas) y vitamina C, generan un estado de cromatina abierta en el locus de *Foxp3* en células iTregs de ratón y humanas<sup>[357]</sup>. Además, estas células iTregs mantuvieron la expresión del FOXP3 ante un microambiente inflamatorio tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>[357]</sup>. Más importante, estas

células iTregs fueron capaces de prevenir el rechazo de aloinjertos de piel<sup>[355, 357]</sup>, así como, inhibir los síntomas de la EICH<sup>[354]</sup>, la respuesta de hipersensibilidad y enfermedad autoinmune<sup>[357]</sup>, en modelos preclínicos. Una última estrategia ha sido la modificación de la cromatina mediante el uso de la tecnología CRISPR-dCas9 acoplado a la TET, y aunque hasta ahora se ha obtenido una desmetilación parcial de la CNS2 en células iTregs<sup>[358]</sup>, esta herramienta molecular tiene la ventaja de poder editar regiones específicas del ADN y de esta manera estabilizar el fenotipo.

Alternativamente, un segundo enfoque sería aislar y expandir células Tregs que presenten una mayor estabilidad fenotípica ante una estimulación *in vitro*. Se han propuestos distintas combinaciones de marcadores para el aislamiento de células Tregs de sangre con fines terapéuticos. Las primeras combinaciones se basan en la expresión de CD45RA, ya que se ha reportado que las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD45RA<sup>+</sup><sup>[257, 359]</sup> y las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>CD45RA<sup>+</sup><sup>[360, 361]</sup> mantienen la expresión del FOXP3 después de una expansión *ex vivo* a largo plazo (>3 de semanas) y muestran una mayor capacidad supresora *in vitro*, comparada con las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>, lo que se correlaciona con un mayor porcentaje de desmetilación de la TSDR. Adicionalmente, en humanos se han descrito dos subpoblaciones de células Tregs fenotípicamente estables que pueden ser distinguidas después de una estimulación del TCR *in vitro*, las células Tregs CD137<sup>+</sup>CD154<sup>-</sup><sup>[362]</sup> y las CD27<sup>+</sup>CD70<sup>-</sup><sup>[363]</sup>: ambas poblaciones muestran una mayor proporción de células CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, superior capacidad para inhibir la proliferación de las células Tconv *in vitro*, menor producción de citocinas inflamatorias (IL-17, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) e incremento de la desmetilación de citosinas en distintas TSDRs (*Foxp3*, *Ctla4*, *Ikzf2*, *Ikzf4*); cada característica en comparación con sus contrapartes las células CD137<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> y las CD27<sup>-</sup>CD70<sup>+</sup>, respectivamente. De manera notable, ambas subpoblaciones de Tregs mantienen sus características inmunorreguladoras después de una estimulación *in vitro* a largo plazo<sup>[362, 363]</sup>.

Finalmente, en investigaciones futuras sería de gran interés diseñar y realizar un protocolo de expansión *ex vivo* de células Tregs, en el cual se combine el aislamiento de Tregs funcionalmente estables ante un estímulo prolongado y la adición de modificadores de la cromatina, con el fin de obtener un producto celular con gran potencial terapéutico en pacientes con trasplante renal.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ogobuiro, I. and F. Tuma.(consultado 1 de abril 2020). Physiology, Renal. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538339/?report=classic>.
2. INEGI.(consultado 24 marzo 2020). Estadísticas de las defunciones en México. Disponible: <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2019/EstSociodem/DefuncionesRegistradas2019.pdf>.
3. Chawla, L.S., et al., Acute kidney disease and renal recovery: consensus report of the Acute Disease Quality Initiative (ADQI) 16 Workgroup. *Nat Rev Nephrol*, 2017. 13(4): p. 241-257.
4. Vaidya, S.R. and N.R. Aeddula, Chronic Renal Failure, in StatPearls. 2019: *Treasure Island (FL)*.
5. Romagnani, P., et al., Chronic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers*, 2017. 3: p. 17088.
6. Méndez-Durán, A., et al., Epidemiología de la insuficiencia renal crónica en México. *Diálisis y Trasplante*, 2010.
7. INEGI.(consultado 24 marzo 2020). ENSANUT. Disponible: <https://www.inegi.org.mx/programas/ensanut/2018/>.
8. Aldrete-Velasco, J., et al., Mortalidad por enfermedad renal crónica y su relación con la diabetes en México % Medicina interna de México. *Med Int Méx*, 2018. 34: p. 536-550.
9. CENATRA.(consultado 24 marzo 2020). Informe Anual. Disponible: [http://cenatra.salud.gob.mx/transparencia/trasplante\\_estadisticas.html](http://cenatra.salud.gob.mx/transparencia/trasplante_estadisticas.html).
10. Rich, R.R., et al., Clinical Immunology: Principles and Practice. Clinical Immunology (Fifth Edition), ed. R.R. Rich, et al. 2019, *London: Content Repository Only!* 1323.
11. Moreau, A., et al., Effector mechanisms of rejection. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013. 3(11): p. a015461.
12. Naik, R.H. and S.H. Shawar, Renal Transplantation Rejection, in StatPearls. 2020, *StatPearls Publishing: Treasure Island (FL)*.
13. Zimmerman, D., et al., The Risk of Acute Rejection Following Kidney Transplant by 25-Hydroxyvitamin D and 1,25-Dihydroxyvitamin D Status: A Prospective Cohort Study. *Canadian journal of kidney health and disease*, 2017. 4: p. 2054358117699822-2054358117699822.
14. Morales-Buenrostro, L.E., L.A. Marino-Vázquez, and J. Alberú, Four decades of the kidney transplantation program at the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán in Mexico City. *Clin Transpl*, 2009: p. 153-64.
15. Carminatti, M., et al., Chronic kidney disease progression in kidney transplant recipients: A focus on traditional risk factors. *Nephrology*, 2019. 24(2): p. 141-147.
16. Legendre, C., G. Canaud, and F. Martinez, Factors influencing long-term outcome after kidney transplantation. *Transpl Int*, 2014. 27(1): p. 19-27.
17. Otterbein, L.E., et al., Innate immunity for better or worse govern the allograft response. *Curr Opin Organ Transplant*, 2015. 20(1): p. 8-12.
18. Georgel, P., Innate immune receptors in solid organ transplantation. *Hum Immunol*, 2016. 77(11): p. 1071-1075.
19. Farrar, C.A., J.W. Kupiec-Weglinski, and S.H. Sacks, The innate immune system and transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013. 3(10): p. a015479-a015479.
20. Goldstein, D.R., et al., Critical role of the Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 in acute allograft rejection. *J Clin Invest*, 2003. 111(10): p. 1571-8.
21. McKay, D., et al., Simultaneous deletion of MyD88 and Trif delays major histocompatibility and minor antigen mismatch allograft rejection. *Eur J Immunol*, 2006. 36(8): p. 1994-2002.
22. Sharbafi, M.H., et al., TLR-2, TLR-4 and MyD88 genes expression in renal transplant acute and chronic rejections. *Int J Immunogenet*, 2019. 46(6): p. 427-436.
23. Krüger, B., et al., Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation. *PNAS USA*, 2009. 106(9): p. 3390-3395.
24. Thierry, A., et al., The alarmin concept applied to human renal transplantation: evidence for a differential implication of HMGB1 and IL-33. *PLoS One*, 2014. 9(2): p. e88742.
25. Zhao, S.Q., Z.Z. Xue, and L.Z. Wang, HMGB1, TGF- $\beta$  and NF- $\kappa$ B are associated with chronic allograft nephropathy. *Exp Ther Med*, 2017. 14(6): p. 6138-6146.
26. Li, J., et al., Neutralization of the extracellular HMGB1 released by ischaemic damaged renal cells protects against renal ischaemia-reperfusion injury. *Nephrol Dial Transpl*, 2011. 26(2): p. 469-78.
27. Miura, K., et al., Protective effect of neutralization of the extracellular high-mobility group box 1 on renal ischemia-reperfusion injury in miniature swine. *Transplantation*, 2014. 98(9): p. 937-43.
28. Lv, Q., et al., The role of HMGB1 in heart transplantation. *Immunol Lett*, 2018. 194: p. 1-3.
29. Koo, T.Y., et al., The P2X7 receptor antagonist, oxidized adenosine triphosphate, ameliorates renal ischemia-reperfusion injury by expansion of regulatory T cells. *Kidney Int*, 2017. 92(2): p. 415-431.
30. Vergani, A., et al., Long-term heart transplant survival by targeting the ionotropic purinergic receptor P2X7. *Circulation*, 2013. 127(4): p. 463-75.

31. Amores-Iniesta, J., et al., Extracellular ATP Activates the NLRP3 Inflammasome and Is an Early Danger Signal of Skin Allograft Rejection. *Cell Rep*, 2017. 21(12): p. 3414-3426.
32. Zhang, P.L., et al., Heat shock protein expression is highly sensitive to ischemia-reperfusion injury in rat kidneys. *Ann Clin Lab Sci*, 2008. 38(1): p. 57-64.
33. Maehana, T., et al., Heat Shock Protein 90 $\alpha$  Is a Potential Serological Biomarker of Acute Rejection after Renal Transplantation. *PLoS One*, 2016. 11(9): p. e0162942.
34. Wu, H., et al., TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest*, 2007. 117(10): p. 2847-59.
35. Wells, A., et al., Increased hyaluronan in acutely rejecting human kidney grafts. *Transplantation*, 1993. 55(6): p. 1346-9.
36. Béland, S., et al., Innate immunity in solid organ transplantation: an update and therapeutic opportunities. *Expert Rev Clin Immunol*, 2015. 11(3): p. 377-89.
37. Zhuang, Q. and F.G. Lakkis, Dendritic cells and innate immunity in kidney transplantation. *Kidney Int*, 2015. 87(4): p. 712-718.
38. Samy, K.P. and T.V. Brennan, Dendritic Cell Therapy in Transplantation, Phenotype Governs Destination and Function. *Transplantation*, 2018. 102(10): p. 1593-1594.
39. Rosen, S.J., P.E. Harris, and M.A. Hardy, State of the Art: Role of the Dendritic Cell in Induction of Allograft Tolerance. *Transplantation*, 2018. 102(10): p. 1603-1613.
40. Siu, J.H.Y., et al., T cell Allorecognition Pathways in Solid Organ Transplantation. *Front Immunol*, 2018. 9: p. 2548-2548.
41. Marino, J., J. Paster, and G. Benichou, Allorecognition by T Lymphocytes and Allograft Rejection. *Front Immunol*, 2016. 7(582).
42. Benichou, G., et al., Extracellular vesicles in allograft rejection and tolerance. *Cell Immunol*, 2020. 349: p. 104063.
43. Hartigan, C.R., H. Sun, and M.L. Ford, Memory T-cell exhaustion and tolerance in transplantation. *Immunol Rev*, 2019. 292(1): p. 225-242.
44. Chalasani, G., et al., Recall and propagation of allospecific memory T cells independent of secondary lymphoid organs. *PNAS USA*, 2002. 99(9): p. 6175-80.
45. Obhrai, J.S., et al., Effector T cell differentiation and memory T cell maintenance outside secondary lymphoid organs. *J Immunol*, 2006. 176(7): p. 4051-8.
46. Walch, J.M., et al., Cognate antigen directs CD8+ T cell migration to vascularized transplants. *J Clin Invest*, 2013. 123(6): p. 2663-71.
47. Zhuang, Q., et al., Graft-infiltrating host dendritic cells play a key role in organ transplant rejection. *Nat Commun*, 2016. 7: p. 12623.
48. Liu, Z., H. Fan, and S. Jiang, CD4(+) T-cell subsets in transplantation. *Immunol Rev*, 2013. 252(1): p. 183-91.
49. Chong, A.S., B cells as antigen-presenting cells in transplantation rejection and tolerance. *Cell Immunol*, 2020. 349: p. 104061.
50. Holt, C.D., Overview of Immunosuppressive Therapy in Solid Organ Transplantation. *Anesthesiol Clin*, 2017. 35(3): p. 365-380.
51. Kumar, D., S. LeCorchick, and G. Gupta, Belatacept As an Alternative to Calcineurin Inhibitors in Patients with Solid Organ Transplants. *Front Med*, 2017. 4: p. 60.
52. Vincenti, F., et al., Belatacept and Long-Term Outcomes in Kidney Transplantation. *N Engl J Med*, 2016. 374(4): p. 333-43.
53. Vincenti, F., et al., A phase III study of belatacept-based immunosuppression regimens versus cyclosporine in renal transplant recipients (BENEFIT study). *Am J Transplant*, 2010. 10(3): p. 535-46.
54. Cohen-Bucay, A., C.E. Gordon, and J.M. Francis, Non-immunological complications following kidney transplantation. *F1000 Research*, 2019. 8: p. F1000 Faculty Rev-194.
55. 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.
56. Newell, K.A., A.B. Adams, and L.A. Turka, Biomarkers of operational tolerance following kidney transplantation - The immune tolerance network studies of spontaneously tolerant kidney transplant recipients. *Hum Immunol*, 2018. 79(5): p. 380-387.
57. Vionnet, J. and A. Sánchez-Fueyo, Biomarkers of immune tolerance in liver transplantation. *Hum Immunol*, 2018. 79(5): p. 388-394.
58. Sakaguchi, S., et al., FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*, 2010. 10(7): p. 490-500.
59. Li, J., et al., Regulatory T-Cells: Potential Regulator of Tissue Repair and Regeneration. *Front Immunol*, 2018. 9: p. 585.
60. Lu, L., J. Barbi, and F. Pan, The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat Rev Immunol*, 2017. 17(11): p. 703-717.

61. Li, M.O. and A.Y. Rudensky, T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function. *Nat Rev Immunol*, 2016. 16(4): p. 220-33.
62. Moran, A.E., et al., T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J Exp Med*, 2011. 208(6): p. 1279-89.
63. 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.
64. Klein, L., E.A. Robey, and C.S. Hsieh, Central CD4(+) T cell tolerance: deletion versus regulatory T cell differentiation. *Nat Rev Immunol*, 2019. 19(1): p. 7-18.
65. 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.
66. 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.
67. 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.
68. Pompura, S.L. and M. Dominguez-Villar, The PI3K/AKT signaling pathway in regulatory T-cell development, stability, and function. *J Leukoc Biol*, 2018.
69. Ouyang, W., et al., Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 2010. 11(7): p. 618-27.
70. Kerdiles, Y.M., et al., Foxo transcription factors control regulatory T cell development and function. *Immunity*, 2010. 33(6): p. 890-904.
71. Bilate, A.M. and J.J. Lafaille, Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. *Annu Rev Immunol*, 2012. 30: p. 733-58.
72. Kanamori, M., et al., Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends Immunol*, 2016. 37(11): p. 803-811.
73. Huehn, J. and M. Beyer, Epigenetic and transcriptional control of Foxp3+ regulatory T cells. *Semin Immunol*, 2015. 27(1): p. 10-8.
74. Shu, Y., et al., Epigenetic Variability of CD4+CD25+ Tregs Contributes to the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2017. 52(2): p. 260-272.
75. Morikawa, H., et al., Differential roles of epigenetic changes and Foxp3 expression in regulatory T cell-specific transcriptional regulation. *PNAS USA*, 2014. 111(14): p. 5289-94.
76. Qiu, R., et al., Regulatory T Cell Plasticity and Stability and Autoimmune Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2020. 58(1): p. 52-70.
77. Lee, W. and G.R. Lee, Transcriptional regulation and development of regulatory T cells. *Exp Mol Med*, 2018. 50(3): p. e456.
78. Kitagawa, Y., et al., Guidance of regulatory T cell development by Satb1-dependent super-enhancer establishment. *Nat Immunol*, 2017. 18(2): p. 173-183.
79. 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.
80. 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.
81. Li, X., et al., Function of a Foxp3 cis-element in protecting regulatory T cell identity. *Cell*, 2014. 158(4): p. 734-48.
82. 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.
83. Wei, X., et al., Reciprocal Expression of IL-35 and IL-10 Defines Two Distinct Effector Treg Subsets that Are Required for Maintenance of Immune Tolerance. *Cell Rep*, 2017. 21(7): p. 1853-1869.
84. Cobbold, S.P., et al., Induction of foxP3+ Regulatory T Cells in the Periphery of T Cell Receptor Transgenic Mice Tolerized to Transplants. *J Immunol*, 2004. 172(10): p. 6003-6010.
85. Takiishi, T., et al., Early IL-10 production is essential for syngeneic graft acceptance. *J Leukoc Biol*, 2012. 92(2): p. 259-64.
86. Liu, K.S., et al., Effects of recombinant human interleukin-10 on Treg cells, IL-10 and TGF- $\beta$  in transplantation of rabbit skin. *Mol Med Rep*, 2014. 9(2): p. 639-44.
87. Oishi, H., et al., A novel combined ex vivo and in vivo lentiviral interleukin-10 gene delivery strategy at the time of transplantation decreases chronic lung allograft rejection in mice. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2018. 156(3): p. 1305-1315.
88. Machuca, T.N., et al., Safety and Efficacy of Ex Vivo Donor Lung Adenoviral IL-10 Gene Therapy in a Large Animal Lung Transplant Survival Model. *Hum Gene Ther*, 2017. 28(9): p. 757-765.
89. Mulligan, M.S., et al., Regulatory role of Th-2 cytokines, IL-10 and IL-4, in cardiac allograft rejection. *Exp Mol Pathol*, 2000. 69(1): p. 1-9.

90. Feng, X., et al., IL-10/Fc inhibits macrophage function and prolongs pancreatic islet xenograft survival. *Transplantation*, 1999. 68(11): p. 1775-83.
91. Chen, B., et al., Adeno-associated viral vector-mediated interleukin-10 prolongs allograft survival in a rat kidney transplantation model. *Am J Transplant*, 2007. 7(5): p. 1112-20.
92. Rubtsov, Y.P., et al., Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity*, 2008. 28(4): p. 546-58.
93. Li, M.O., et al., Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 2006. 24: p. 99-146.
94. 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.
95. Carli, C., M. Giroux, and J.S. Delisle, Roles of transforming growth factor- $\beta$  in graft-versus-host and graft-versus-tumor effects. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2012. 18(9): p. 1329-40.
96. 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.
97. 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.
98. Shen, E., et al., The suppressive effect of CD25+Treg cells on Th1 differentiation requires cell-cell contact partially via TGF- $\beta$  production. *Cell Biol Int*, 2011. 35(7): p. 705-12.
99. Collison, L.W., et al., IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol*, 2010. 11(12): p. 1093-101.
100. Collison, L.W., et al., The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 2007. 450(7169): p. 566-9.
101. Guo, H., et al., Inhibiting cardiac allograft rejection with interleukin-35 therapy combined with decitabine treatment in mice. *Transpl Immunol*, 2013. 29(1-4): p. 99-104.
102. Zongyi, Y., et al., Interleukin-35 mitigates the function of murine transplanted islet cells via regulation of Treg/Th17 ratio. *PLoS One*, 2017. 12(12): p. e0189617.
103. Liu, Y., et al., IL-35 mitigates murine acute graft-versus-host disease with retention of graft-versus-leukemia effects. *Leukemia*, 2015. 29(4): p. 939-46.
104. Zhang, X.H., et al., IL-35 inhibits acute graft-versus-host disease in a mouse model. *Int Immunopharmacol*, 2015. 29(2): p. 383-392.
105. Duffy, S.S., et al., Regulatory T Cells and Their Derived Cytokine, Interleukin-35, Reduce Pain in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Neurosci*, 2019. 39(12): p. 2326-2346.
106. Whitehead, G.S., et al., IL-35 production by inducible costimulator (ICOS)-positive regulatory T cells reverses established IL-17-dependent allergic airways disease. *J Allergy Clin Immunol*, 2012. 129(1): p. 207-15.e1-5.
107. Liu, J., et al., Human placental trophoblast cells contribute to maternal-fetal tolerance through expressing IL-35 and mediating iT(R)35 conversion. *Nat Commun*, 2019. 10(1): p. 4601.
108. Zaiss, D.M., C.M. Minutti, and J.A. Knipper, Immune- and non-immune-mediated roles of regulatory T-cells during wound healing. *Immunology*, 2019. 157(3): p. 190-197.
109. Okoye, I.S., et al., MicroRNA-containing T-regulatory-cell-derived exosomes suppress pathogenic T helper 1 cells. *Immunity*, 2014. 41(1): p. 89-103.
110. 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.
111. Iikuni, N., et al., Cutting edge: Regulatory T cells directly suppress B cells in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, 2009. 183(3): p. 1518-22.
112. Zhao, D.-M., et al., Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood*, 2006. 107(10): p. 3925-32.
113. Baatar, D., et al., Human peripheral blood T regulatory cells (Tregs), functionally primed CCR4+ Tregs and unprimed CCR4- Tregs, regulate effector T cells using FasL. *J Immunol*, 2007. 178(8): p. 4891-900.
114. Gorbachev, A.V. and R.L. Fairchild, CD4+CD25+ regulatory T cells utilize FasL as a mechanism to restrict DC priming functions in cutaneous immune responses. *Eur J Immunol*, 2010. 40(7): p. 2006-15.
115. Chinen, T., et al., An essential role for the IL-2 receptor in T(reg) cell function. *Nat Immunol*, 2016. 17(11): p. 1322-1333.
116. 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.
117. 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.
118. 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.
119. Rueda, C.M., C.M. Jackson, and C.A. Chougnet, Regulatory T-Cell-Mediated Suppression of Conventional T-Cells and Dendritic Cells by Different cAMP Intracellular Pathways. *Front Immunol*, 2016. 7: p. 216-216.

120. Lee, G.R., S. Shaefi, and L.E. Otterbein, HO-1 and CD39: It Takes Two to Protect the Realm. *Front Immunol*, 2019. 10: p. 1765-1765.
121. Fallarino, F., et al., Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*, 2003. 4(12): p. 1206-12.
122. 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.
123. 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.
124. 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.
125. Delgoffe, G.M., et al., Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis. *Nature*, 2013. 501(7466): p. 252-256.
126. Overacre-Delgoffe, A.E., et al., Interferon- $\gamma$  Drives T(reg) Fragility to Promote Anti-tumor Immunity. *Cell*, 2017. 169(6): p. 1130-1141.e11.
127. 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.
128. Huang, C.-T., et al., Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*, 2004. 21(4): p. 503-13.
129. 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.
130. Segal, E.I., et al., Role of lymphocyte activation gene-3 (Lag-3) in conventional and regulatory T cell function in allogeneic transplantation. *PLoS One*, 2014. 9(1): p. e86551.
131. Wing, J.B., C. Tay, and S. Sakaguchi, Control of Regulatory T Cells by Co-signal Molecules. *Adv Exp Med Biol*, 2019. 1189: p. 179-210.
132. Woods, D.M., et al., Decreased Suppression and Increased Phosphorylated STAT3 in Regulatory T Cells are Associated with Benefit from Adjuvant PD-1 Blockade in Resected Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res*, 2018. 24(24): p. 6236-6247.
133. Stathopoulou, C., et al., PD-1 Inhibitory Receptor Downregulates Asparaginyl Endopeptidase and Maintains Foxp3 Transcription Factor Stability in Induced Regulatory T Cells. *Immunity*, 2018. 49(2): p. 247-263.e7.
134. Cai, J., et al., The Role Of PD-1/PD-L1 Axis In Treg Development And Function: Implications For Cancer Immunotherapy. *OncoTargets and therapy*, 2019. 12: p. 8437-8445.
135. Gupta, S., et al., Allograft rejection is restrained by short-lived TIM-3+PD-1+Foxp3+ Tregs. *J Clin Invest*, 2012. 122(7): p. 2395-404.
136. Gautron, A.S., et al., Enhanced suppressor function of TIM-3+ FoxP3+ regulatory T cells. *Eur J Immunol*, 2014. 44(9): p. 2703-2711.
137. Joller, N., et al., Treg cells expressing the coinhibitory molecule TIGIT selectively inhibit proinflammatory Th1 and Th17 cell responses. *Immunity*, 2014. 40(4): p. 569-81.
138. Tiemessen, M.M., et al., CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *PNAS USA*, 2007. 104(49): p. 19446-51.
139. Romano, M., et al., Expanded Regulatory T Cells Induce Alternatively Activated Monocytes With a Reduced Capacity to Expand T Helper-17 Cells. *Front Immunol*, 2018. 9: p. 1625.
140. Richards, H., et al., Novel role of regulatory T cells in limiting early neutrophil responses in skin. *Immunology*, 2010. 131(4): p. 583-92.
141. Lewkowicz, N., et al., Neutrophil-CD4+CD25+ T regulatory cell interactions: a possible new mechanism of infectious tolerance. *Immunobiology*, 2013. 218(4): p. 455-64.
142. Yi, S., et al., Adoptive transfer with in vitro expanded human regulatory T cells protects against porcine islet xenograft rejection via interleukin-10 in humanized mice. *Diabetes*, 2012. 61(5): p. 1180-91.
143. Zhang, P. and G.R. Hill, Interleukin-10 mediated immune regulation after stem cell transplantation: Mechanisms and implications for therapeutic intervention. *Semin Immunol*, 2019. 44: p. 101322.
144. Daley, S.R., et al., A Key Role for TGF- $\beta$  Signaling to T Cells in the Long-Term Acceptance of Allografts. *J Immunol*, 2007. 179(6): p. 3648-3654.
145. Lee, K.M., et al., TGF- $\beta$ -producing regulatory B cells induce regulatory T cells and promote transplantation tolerance. *Eur J Immunol*, 2014. 44(6): p. 1728-1736.
146. Baas, M., et al., TGF $\beta$ -dependent expression of PD-1 and PD-L1 controls CD8(+) T cell anergy in transplant tolerance. *Elife*, 2016. 5: p. e08133.
147. Liu, Q., et al., Amphiregulin stimulates liver regeneration after small-for-size mouse liver transplantation. *Am J Transplant*, 2012. 12(8): p. 2052-61.
148. 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.

149. Velaga, S., et al., Granzyme A Is Required for Regulatory T-Cell Mediated Prevention of Gastrointestinal Graft-versus-Host Disease. *PLoS One*, 2015. 10(4): p. e0124927.
150. Sevigny, C.P., et al., Activation of adenosine 2A receptors attenuates allograft rejection and alloantigen recognition. *J Immunol*, 2007. 178(7): p. 4240-9.
151. Chhabra, P., et al., Adenosine A(2A) agonist administration improves islet transplant outcome: Evidence for the role of innate immunity in islet graft rejection. *Cell Transplant*, 2010. 19(5): p. 597-612.
152. Imai, M., et al., Recombinant adenoviral mediated CD39 gene transfer prolongs cardiac xenograft survival. *Transplantation*, 2000. 70(6): p. 864-70.
153. Hasegawa, T., et al., Ecto-5' nucleotidase (CD73)-mediated adenosine generation and signaling in murine cardiac allograft vasculopathy. *Circ Res*, 2008. 103(12): p. 1410-21.
154. Lau, C.L., et al., The role of adenosine A2A receptor signaling in bronchiolitis obliterans. *Ann Thorac Surg*, 2009. 88(4): p. 1071-1078.
155. Yoshida, O., et al., CD39 deficiency in murine liver allografts promotes inflammatory injury and immune-mediated rejection. *Transpl Immunol*, 2015. 32(2): p. 76-83.
156. Lin, H., et al., Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA4) blockade accelerates the acute rejection of cardiac allografts in CD28-deficient mice: CTLA4 can function independently of CD28. *J Exp Med*, 1998. 188(1): p. 199-204.
157. Judge, T.A., et al., The role of CD80, CD86, and CTLA4 in alloimmune responses and the induction of long-term allograft survival. *J Immunol*, 1999. 162(4): p. 1947-51.
158. Chandraker, A., et al., CTLA-4 is important in maintaining long-term survival of cardiac allografts. *Transplantation*, 2005. 79(8): p. 897-903.
159. Coenen, J.J., et al., CTLA-4 engagement and regulatory CD4+CD25+ T cells independently control CD8+-mediated responses under costimulation blockade. *J Immunol*, 2006. 176(9): p. 5240-6.
160. Zhang, T., et al., Selective CD28 blockade attenuates acute and chronic rejection of murine cardiac allografts in a CTLA-4-dependent manner. *Transplantation*, 2011. 11(8): p. 1599-609.
161. Ariyan, C., et al., Cutting edge: transplantation tolerance through enhanced CTLA-4 expression. *J Immunol*, 2003. 171(11): p. 5673-7.
162. Kurtz, J., et al., CTLA-4 on alloreactive CD4 T cells interacts with recipient CD80/86 to promote tolerance. *Blood*, 2009. 113(15): p. 3475-84.
163. Schwarz, C., et al., The Immunosuppressive Effect of CTLA4 Immunoglobulin Is Dependent on Regulatory T Cells at Low But Not High Doses. *Am J Transplant*, 2016. 16(12): p. 3404-3415.
164. Young, J.S., et al., Delayed Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Protein 4-Immunoglobulin Treatment Reverses Ongoing Alloantibody Responses and Rescues Allografts From Acute Rejection. *Am J Transplant*, 2016. 16(8): p. 2312-23.
165. Khiew, S.H., et al., CTLA4-Ig in combination with FTY720 promotes allograft survival in sensitized recipients. *JCI insight*, 2017. 2(9): p. e92033.
166. Young, J.S., et al., Successful Treatment of T Cell-Mediated Acute Rejection with Delayed CTLA4-Ig in Mice. *Front Immunol*, 2017. 8: p. 1169.
167. Liu, D., I.R. Badell, and M.L. Ford, Selective CD28 blockade attenuates CTLA-4-dependent CD8+ memory T cell effector function and prolongs graft survival. *JCI Insight*, 2018. 3(1).
168. Campos-Mora, M., et al., CD4+Foxp3+T Regulatory Cells Promote Transplantation Tolerance by Modulating Effector CD4+ T Cells in a Neuropilin-1-Dependent Manner. *Front Immunol*, 2019. 10: p. 882-882.
169. Campos-Mora, M., et al., Neuropilin-1+ regulatory T cells promote skin allograft survival and modulate effector CD4+ T cells phenotypic signature. *Immunol Cell Biol*, 2015. 93(2): p. 113-9.
170. Tripathi, D., et al., c-Jun N-terminal kinase 1 defective CD4+CD25+FoxP3+ cells prolong islet allograft survival in diabetic mice. *Sci Rep*, 2018. 8(1): p. 3310.
171. Lucas, C.L., et al., LAG-3, TGF-beta, and cell-intrinsic PD-1 inhibitory pathways contribute to CD8 but not CD4 T-cell tolerance induced by allogeneic BMT with anti-CD40L. *Blood*, 2011. 117(20): p. 5532-40.
172. Takahashi, T., et al., PD-1 expression on CD8(+) T cells regulates their differentiation within lung allografts and is critical for tolerance induction. *Am J Transplant*, 2018. 18(1): p. 216-225.
173. Wang, W., et al., PD-L1/PD-1 signal deficiency promotes allogeneic immune responses and accelerates heart allograft rejection. *Transplantation*, 2008. 86(6): p. 836-44.
174. Thangavelu, G., et al., The role of co-inhibitory signals in spontaneous tolerance of weakly mismatched transplants. *Immunobiology*, 2011. 216(8): p. 918-24.
175. Wang, L., R. Han, and W.W. Hancock, Programmed cell death 1 (PD-1) and its ligand PD-L1 are required for allograft tolerance. *Eur J Immunol*, 2007. 37(10): p. 2983-90.
176. Morita, M., et al., PD-1/B7-H1 interaction contribute to the spontaneous acceptance of mouse liver allograft. *Am J Transplant*, 2010. 10(1): p. 40-6.
177. Haspot, F., et al., Peripheral deletional tolerance of alloreactive CD8 but not CD4 T cells is dependent on the PD-1/PD-L1 pathway. *Blood*, 2008. 112(5): p. 2149-55.

178. Arefanian, H., et al., Porcine Islet-Specific Tolerance Induced by the Combination of Anti-LFA-1 and Anti-CD154 mAbs Is Dependent on PD-1. *Cell Transplant*, 2016. 25(2): p. 327-42.
179. Leung, C.S., et al., Single-cell transcriptomics reveal that PD-1 mediates immune tolerance by regulating proliferation of regulatory T cells. *Genome medicine*, 2018. 10(1): p. 71-71.
180. Koehn, B.H., et al., PD-1-dependent mechanisms maintain peripheral tolerance of donor-reactive CD8+ T cells to transplanted tissue. *J Immunol*, 2008. 181(8): p. 5313-22.
181. Wang, F., et al., Tim-3-Galectin-9 pathway involves the suppression induced by CD4+CD25+ regulatory T cells. *Immunobiology*, 2009. 214(5): p. 342-9.
182. Zhang, D., et al., TIGIT-Fc alleviates acute graft-versus-host disease by suppressing CTL activation via promoting the generation of immunoregulatory dendritic cells. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018. 1864(9 Pt B): p. 3085-3098.
183. Hu, M., et al., Infiltrating Foxp3(+) regulatory T cells from spontaneously tolerant kidney allografts demonstrate donor-specific tolerance. *Am J Transplant*, 2013. 13(11): p. 2819-30.
184. Miyajima, M., et al., Early acceptance of renal allografts in mice is dependent on foxp3(+) cells. *Am J Pathol*, 2011. 178(4): p. 1635-45.
185. Pasquet, L., et al., Long-term prevention of chronic allograft rejection by regulatory T-cell immunotherapy involves host Foxp3-expressing T cells. *Blood*, 2013. 121(21): p. 4303-10.
186. Shinoda, K., et al., Depletion of foxp3(+) T cells abrogates tolerance of skin and heart allografts in murine mixed chimeras without the loss of mixed chimerism. *Am J Transplant*, 2014. 14(10): p. 2263-2274.
187. Wu, C., et al., Apoptotic cell administration enhances pancreatic islet engraftment by induction of regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells. *Cell Mol Immunol*, 2013. 10(5): p. 393-402.
188. Wu, J., et al., In Vivo Costimulation Blockade-Induced Regulatory T Cells Demonstrate Dominant and Specific Tolerance to Porcine Islet Xenografts. *Transplantation*, 2017. 101(7): p. 1587-1599.
189. Ganguly, S., et al., Donor CD4+ Foxp3+ regulatory T cells are necessary for posttransplantation cyclophosphamide-mediated protection against GVHD in mice. *Blood*, 2014. 124(13): p. 2131-41.
190. Pierini, A., et al., Donor Requirements for Regulatory T Cell Suppression of Murine Graft-versus-Host Disease. *J Immunol*, 2015. 195(1): p. 347-55.
191. Alessandrini, A. and L.A. Turka, FOXP3-Positive Regulatory T Cells and Kidney Allograft Tolerance. *Am J Kidney Dis*, 2017. 69(5): p. 667-674.
192. 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.
193. Mezrich, J.D., et al., Mechanisms of tolerance induction in the heart/kidney model in miniature swine. *J Heart Lung Transplant*, 2001. 20(2): p. 172-173.
194. Salman, J., et al., Association of Higher CD4(+) CD25(high) CD127(low) , FoxP3(+) , and IL-2(+) T Cell Frequencies Early After Lung Transplantation With Less Chronic Lung Allograft Dysfunction at Two Years. *Am J Transplant*, 2017. 17(6): p. 1637-1648.
195. Tonsho, M., et al., Effect of Kidney Cotransplantation on Induction of Heart Graft Tolerance in Nonhuman Primates (NHPs): 764. *Transplantation*, 2012. 94(10S).
196. Narula, J., et al., Outcomes in recipients of combined heart-kidney transplantation: multiorgan, same-donor transplant study of the International Society of Heart and Lung Transplantation/United Network for Organ Sharing Scientific Registry. *Transplantation*, 1997. 63(6): p. 861-7.
197. Vermes, E., et al., Long-term results of combined heart and kidney transplantation: a French multicenter study. *J Heart Lung Transplant*, 2009. 28(5): p. 440-5.
198. Vermès, E., et al., Immunologic events and long-term survival after combined heart and kidney transplantation: a 12-year single-center experience. *J Heart Lung Transplant*, 2001. 20(10): p. 1084-91.
199. Nafady-Hego, H., et al., Utility of CD127 combined with FOXP3 for identification of operational tolerance after liver transplantation. *Transpl Immunol*, 2016. 36: p. 1-8.
200. Pons, J.A., et al., FoxP3 in peripheral blood is associated with operational tolerance in liver transplant patients during immunosuppression withdrawal. *Transplantation*, 2008. 86(10): p. 1370-8.
201. Li, Y., et al., The presence of Foxp3 expressing T cells within grafts of tolerant human liver transplant recipients. *Transplantation*, 2008. 86(12): p. 1837-43.
202. Braza, F., et al., Central Role of CD45RA- Foxp3hi Memory Regulatory T Cells in Clinical Kidney Transplantation Tolerance. *J Am Soc Nephrol*, 2015. 26(8): p. 1795-805.
203. Louis, S., et al., Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation*, 2006. 81(3): p. 398-407.
204. Nguyen, M.T., et al., Pretransplantation recipient regulatory T cell suppressive function predicts delayed and slow graft function after kidney transplantation. *Transplantation*, 2014. 98(7): p. 745-53.

205. Nguyen, M.T., et al., Pretransplant Recipient Circulating CD4+CD127lo/- Tumor Necrosis Factor Receptor 2+ Regulatory T Cells: A Surrogate of Regulatory T Cell-Suppressive Function and Predictor of Delayed and Slow Graft Function After Kidney Transplantation. *Transplantation*, 2016. 100(2): p. 314-24.
206. Karczewski, M., et al., The role of Foxp3+ regulatory T cells in kidney transplantation. *Transplant Proc*, 2009. 41(5): p. 1527-9.
207. Bestard, O., et al., Presence of FoxP3+ regulatory T Cells predicts outcome of subclinical rejection of renal allografts. *J Am Soc Nephrol*, 2008. 19(10): p. 2020-6.
208. Bestard, O., et al., Intragraft regulatory T cells in protocol biopsies retain foxp3 demethylation and are protective biomarkers for kidney graft outcome. *Am J Transplant*, 2011. 11(10): p. 2162-72.
209. Yan, L., et al., Increased circulating Tfh to Tfr ratio in chronic renal allograft dysfunction: a pilot study. *BMC Immunol*, 2019. 20(1): p. 26.
210. Lin, W.X., et al., Foxp3+ T cells in peripheral blood of renal transplant recipients and clinical correlations. *Nephrology*, 2012. 17(4): p. 415-22.
211. Schaier, M., et al., DR(high+)CD45RA(-)-Tregs potentially affect the suppressive activity of the total Treg pool in renal transplant patients. *PLoS One*, 2012. 7(3): p. e34208.
212. San Segundo, D., et al., High regulatory T-cell levels at 1 year posttransplantation predict long-term graft survival among kidney transplant recipients. *Transplant Proc*, 2012. 44(9): p. 2538-41.
213. Liu, L., et al., Absolute of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T-cell count rather than its ratio in peripheral blood is related to long-term survival of renal allografts. *Transplant Proc*, 2012. 44(1): p. 284-6.
214. Macedo, C., et al., Long-term effects of alemtuzumab on regulatory and memory T-cell subsets in kidney transplantation. *Transplantation*, 2012. 93(8): p. 813-21.
215. Roldán, C., et al., CD4+CD45RO+CD25-/lowCD127+: CD4+CD45RO+CD25hiCD127-/low Ratio in Peripheral Blood: A Useful Biomarker to Detect Cardiac Allograft Vasculopathy in Heart Transplanted Patients. *Transplantation*, 2015. 99(7): p. 1521-8.
216. Stenard, F., et al., Decreases in circulating CD4+CD25hiFOXP3+ cells and increases in intragraft FOXP3+ cells accompany allograft rejection in pediatric liver allograft recipients. *Pediatr Transplant*, 2009. 13(1): p. 70-80.
217. 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.
218. 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.
219. 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.
220. MacDonald, K.N., J.M. Piret, and M.K. Levings, Methods to manufacture regulatory T cells for cell therapy. *Clin. Exp. Immunol.*, 2019. 197(1): p. 52-63.
221. Tang, Q. and J.A. Bluestone, Regulatory T-cell therapy in transplantation: moving to the clinic. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013. 3(11).
222. Vaikunthanathan, T., et al., Regulatory T cells: tolerance induction in solid organ transplantation. *J Clin Invest*, 2017. 127(2): p. 197-210.
223. Pilat, N., et al., Polyclonal Recipient nTregs Are Superior to Donor or Third-Party Tregs in the Induction of Transplantation Tolerance. *J Immunol Res*, 2015. 2015: p. 562935.
224. Guo, X., et al., In vitro-expanded CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells controls corneal allograft rejection. *Hum Immunol*, 2012. 73(11): p. 1061-7.
225. Xia, G., et al., Targeting acute allograft rejection by immunotherapy with ex vivo-expanded natural CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Transplantation*, 2006. 82(12): p. 1749-55.
226. Xia, G., J. He, and J.R. Leventhal, Ex vivo-expanded natural CD4+CD25+ regulatory T cells synergize with host T-cell depletion to promote long-term survival of allografts. *Am J Transplant*, 2008. 8(2): p. 298-306.
227. Taylor, P.A., C.J. Lees, and B.R. Blazar, The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood*, 2002. 99(10): p. 3493-9.
228. Xia, G., et al., Tracking ex vivo-expanded CD4+CD25+ and CD8+CD25+ regulatory T cells after infusion to prevent donor lymphocyte infusion-induced lethal acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2004. 10(11): p. 748-60.
229. Trenado, A., et al., Ex vivo-expanded CD4+CD25+ immunoregulatory T cells prevent graft-versus-host-disease by inhibiting activation/differentiation of pathogenic T cells. *J Immunol*, 2006. 176(2): p. 1266-73.
230. Cao, T., et al., Ex vivo expanded human CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells prevent lethal xenogenic graft versus host disease (GVHD). *Cell Immunol*, 2009. 258(1): p. 65-71.
231. Issa, F., et al., Ex vivo-expanded human regulatory T cells prevent the rejection of skin allografts in a humanized mouse model. *Transplantation*, 2010. 90(12): p. 1321-7.

232. Wu, D.C., et al., Ex vivo expanded human regulatory T cells can prolong survival of a human islet allograft in a humanized mouse model. *Transplantation*, 2013. 96(8): p. 707-16.
233. Nishimura, E., et al., Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol*, 2004. 16(8): p. 1189-201.
234. Jiang, S., et al., In vitro expanded alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cell treatment for the induction of donor-specific transplantation tolerance. *Int Immunopharmacol*, 2006. 6(13-14): p. 1879-82.
235. Sánchez-Fueyo, A., et al., Specificity of CD4+CD25+ regulatory T cell function in alloimmunity. *J Immunol*, 2006. 176(1): p. 329-34.
236. Golshayan, D., et al., In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. *Blood*, 2007. 109(2): p. 827-35.
237. Chai, J.G., et al., In vitro expansion improves in vivo regulation by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*, 2008. 180(2): p. 858-69.
238. 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.
239. 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.
240. Golshayan, D., et al., Transplantation tolerance induced by regulatory T cells: in vivo mechanisms and sites of action. *Int Immunopharmacol*, 2009. 9(6): p. 683-8.
241. Fu, B.M., et al., A tolerogenic semimature dendritic cells induce effector T-cell hyporesponsiveness by activation of antigen-specific CD4+CD25+ T regulatory cells that promotes skin allograft survival in mice. *Cell Immunol*, 2010. 261(1): p. 69-76.
242. Noël, G., et al., Direct alloreactivity is more susceptible to regulation by natural regulatory T cells than indirect alloreactivity. *J Immunol*, 2013. 190(7): p. 3764-71.
243. Tsang, J.Y., et al., Indefinite mouse heart allograft survival in recipient treated with CD4(+)CD25(+) regulatory T cells with indirect allospecificity and short term immunosuppression. *Transpl Immunol*, 2009. 21(4): p. 203-9.
244. Verma, N.D., et al., CD4+CD25+ T cells alloactivated ex vivo by IL-2 or IL-4 become potent alloantigen-specific inhibitors of rejection with different phenotypes, suggesting separate pathways of activation by Th1 and Th2 responses. *Blood*, 2009. 113(2): p. 479-87.
245. Raimondi, G., et al., Mammalian target of rapamycin inhibition and alloantigen-specific regulatory T cells synergize to promote long-term graft survival in immunocompetent recipients. *J Immunol*, 2010. 184(2): p. 624-36.
246. Brennan, T.V., et al., Requirements for prolongation of allograft survival with regulatory T cell infusion in lymphosufficient hosts. *J Surg Res*, 2011. 169(1): p. e69-75.
247. Lee, K., et al., Attenuation of donor-reactive T cells allows effective control of allograft rejection using regulatory T cell therapy. *Am J Transplant*, 2014. 14(1): p. 27-38.
248. 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.
249. He, Y., et al., Adoptive transfer of donor corneal antigen-specific regulatory T cells can prolong mice corneal grafts survival. *Cornea*, 2010. 29 Suppl 1: p. S25-31.
250. 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.
251. Yamazaki, S., et al., Effective expansion of alloantigen-specific Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells by dendritic cells during the mixed leukocyte reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006. 103(8): p. 2758-2763.
252. Putnam, A.L., et al., Clinical grade manufacturing of human alloantigen-reactive regulatory T cells for use in transplantation. *Am J Transplant*, 2013. 13(11): p. 3010-20.
253. Sagoo, P., et al., Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med*, 2011. 3(83): p. 83ra42.
254. Veerapathran, A., et al., Ex vivo expansion of human Tregs specific for alloantigens presented directly or indirectly. *Blood*, 2011. 118(20): p. 5671-80.
255. Jiang, S., et al., Generation and expansion of human CD4+ CD25+ regulatory T cells with indirect allospecificity: Potential reagents to promote donor-specific transplantation tolerance. *Transplantation*, 2006. 82(12): p. 1738-43.
256. Tang, Q. and K. Lee, Regulatory T-cell therapy for transplantation: how many cells do we need? *Curr Opin Organ Transplant*, 2012. 17(4): p. 349-54.
257. 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.
258. Gao, Y., et al., Inflammation negatively regulates FOXP3 and regulatory T-cell function via DBC1. *PNAS USA*, 2015. 112(25): p. E3246-54.
259. Valencia, X., et al., TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood*, 2006. 108(1): p. 253-61.

260. Yang, X.O., et al., Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity*, 2008. 29(1): p. 44-56.
261. 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.
262. 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.
263. Rossetti, M., et al., Ex vivo-expanded but not in vitro-induced human regulatory T cells are candidates for cell therapy in autoimmune diseases thanks to stable demethylation of the FOXP3 regulatory T cell-specific demethylated region. *J Immunol*, 2015. 194(1): p. 113-24.
264. Scotta, C., et al., Differential effects of rapamycin and retinoic acid on expansion, stability and suppressive qualities of human CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) T regulatory cell subpopulations. *Haematologica*, 2013. 98(8): p. 1291-9.
265. 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.
266. Tresoldi, E., et al., Stability of human rapamycin-expanded CD4+CD25+ T regulatory cells. *Haematologica*, 2011. 96(9): p. 1357-65.
267. Lu, L., et al., Critical role of all-trans retinoic acid in stabilizing human natural regulatory T cells under inflammatory conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. 111(33): p. E3432-40.
268. Kim, Y.C., et al., Oligodeoxynucleotides stabilize Helios-expressing Foxp3+ human T regulatory cells during in vitro expansion. *Blood*, 2012. 119(12): p. 2810-8.
269. Camirand, G. and L.V. Riella, Treg-Centric View of Immunosuppressive Drugs in Transplantation: A Balancing Act. *Am J Transplant*, 2017. 17(3): p. 601-610.
270. Furukawa, A., S.A. Wisel, and Q. Tang, Impact of Immune-Modulatory Drugs on Regulatory T Cell. *Transplantation*, 2016. 100(11): p. 2288-2300.
271. Safa, K., S. Chandran, and D. Wojciechowski, Pharmacologic targeting of regulatory T cells for solid organ transplantation: current and future prospects. *Drugs*, 2015. 75(16): p. 1843-52.
272. Alvarez Salazar, E.K., et al., Methylation of FOXP3 TSDR Underlies the Impaired Suppressive Function of Tregs from Long-term Belatacept-Treated Kidney Transplant Patients. *Front Immunol*, 2017. 8: p. 219.
273. Boenisch, O., et al., Ex vivo expansion of human Tregs by rabbit ATG is dependent on intact STAT3-signaling in CD4+ T cells and requires the presence of monocytes. *Am J Transplant*, 2012. 12(4): p. 856-866.
274. Buszko, M., et al., In vitro immunoregulatory effects of thymoglobulin on human immune cell subpopulations. *Immunol Lett*, 2017. 186: p. 1-8.
275. Liu, Z., et al., Upregulation of molecules associated with T-regulatory function by thymoglobulin pretreatment of human CD4+ cells. *Transplantation*, 2008. 86(10): p. 1419-26.
276. Buszko, M., et al., Differential depletion of total T cells and regulatory T cells and prolonged allotransplant survival in CD3E humanized mice treated with polyclonal anti human thymocyte globulin. *PLoS One*, 2017. 12(3): p. e0173088-e0173088.
277. Bouvy, A.P., et al., Alemtuzumab as Antirejection Therapy: T Cell Repopulation and Cytokine Responsiveness. *Transplant Direct*, 2016. 2(6): p. e83.
278. Haas, J., et al., Alemtuzumab in Multiple Sclerosis: Short- and Long-Term Effects of Immunodepletion on the Peripheral Treg Compartment. *Front Immunol*, 2019. 10: p. 1204.
279. Scottà, C., et al., Impact of immunosuppressive drugs on the therapeutic efficacy of ex vivo expanded human regulatory T cells. *Haematologica*, 2016. 101(1): p. 91-100.
280. Jamali, S., et al., Sirolimus vs mycophenolate mofetil in Tacrolimus based therapy following induction with Antithymocyte globulin promotes regulatory T cell expansion and inhibits RORγt and T-bet expression in kidney transplantation. *Hum Immunol*, 2019. 80(9): p. 739-747.
281. Zeng, Q., et al., Effects of tacrolimus (FK506) and mycophenolate mofetil (MMF) on regulatory T cells and co-inhibitory receptors in the peripheral blood of human liver allograft patients. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2019. 41(3): p. 380-385.
282. Ghazal, K., et al., Treatment with mTOR inhibitors after liver transplantation enables a sustained increase in regulatory T-cells while preserving their suppressive capacity. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2018. 42(3): p. 237-244.
283. Mirza, K., et al., Effect of everolimus initiation and early calcineurin inhibitor withdrawal on myocardial FOXP3+ regulatory T cells in heart transplantation. *Transpl Immunol*, 2016. 38: p. 75-7.
284. Sabbatini, M., et al., Oscillatory mTOR inhibition and Treg increase in kidney transplantation. *Clin Exp Immunol*, 2015. 182(2): p. 230-40.
285. Traitanon, O., et al., Mechanistic analyses in kidney transplant recipients prospectively randomized to two steroid free regimen-Low dose Tacrolimus with Everolimus versus standard dose Tacrolimus with Mycophenolate Mofetil. *PLoS one*, 2019. 14(5): p. e0216300-e0216300.

286. Latorre, I., et al., Calcineurin and mTOR inhibitors have opposing effects on regulatory T cells while reducing regulatory B cell populations in kidney transplant recipients. *Transpl Immunol*, 2016. 35: p. 1-6.
287. Gong, N., et al., Immunoregulatory effects of sirolimus vs. tacrolimus treatment in kidney allograft recipients. *Cell Immunol*, 2015. 297(2): p. 87-93.
288. Locke, F.L., et al., CD25 Blockade Delays Regulatory T Cell Reconstitution and Does Not Prevent Graft-versus-Host Disease After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2017. 23(3): p. 405-411.
289. Chakupurakal, G., et al., Immunological effects in patients with steroid-refractory graft-versus-host disease following treatment with basiliximab, a CD25 monoclonal antibody. *Eur J Haematol*, 2016. 97(2): p. 121-7.
290. Li, Y., et al., Differential regulation of Tregs and Th17/Th1 cells by a sirolimus-based regimen might be dependent on STAT-signaling in renal transplant recipients. *Int Immunopharmacol*, 2015. 28(1): p. 435-43.
291. 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.
292. 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.
293. 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.
294. Brunstein, C.G., et al., Umbilical cord blood-derived T regulatory cells to prevent GVHD: kinetics, toxicity profile, and clinical effect. *Blood*, 2016. 127(8): p. 1044-51.
295. Di Ianni, M., et al., Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood*, 2011. 117(14): p. 3921-8.
296. Martelli, M.F., et al., HLA-haploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse. *Blood*, 2014. 124(4): p. 638-44.
297. Meyer, E.H., et al., Transplantation of donor grafts with defined ratio of conventional and regulatory T cells in HLA-matched recipients. *JCI Insight*, 2019. 4(10).
298. Todo, S., et al., A pilot study of operational tolerance with a regulatory T-cell-based cell therapy in living donor liver transplantation. *Hepatology*, 2016. 64(2): p. 632-43.
299. Todo, S. and K. Yamashita, Anti-donor regulatory T cell therapy in liver transplantation. *Hum Immunol*, 2018. 79(5): p. 288-293.
300. Chandran, S., et al., Polyclonal Regulatory T Cell Therapy for Control of Inflammation in Kidney Transplants. *Am J Transplant*, 2017. 17(11): p. 2945-2954.
301. Mathew, J.M., et al., A Phase I Clinical Trial with Ex Vivo Expanded Recipient Regulatory T cells in Living Donor Kidney Transplants. *Sci Rep*, 2018. 8(1): p. 7428.
302. Sawitzki, B., et al., Regulatory cell therapy in kidney transplantation (The ONE Study): a harmonised design and analysis of seven non-randomised, single-arm, phase 1/2A trials. *The Lancet*, 2020. 395(10237): p. 1627-1639.
303. Roemhild, A., et al., Regulatory T cells for minimising immune suppression in kidney transplantation: phase I/IIa clinical trial. *BMJ*, 2020. 371: p. m3734.
304. Kim, H.J., et al., Stable inhibitory activity of regulatory T cells requires the transcription factor Helios. *Science*, 2015. 350(6258): p. 334-9.
305. Förster, R., A.C. Davalos-Misllitz, and A. Rot, CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8: p. 362.
306. Cortes-Hernandez, A., et al., Ex vivo expansion of regulatory T cells from long-term Belatacept-treated kidney transplant patients restores their phenotype and suppressive function but not their FOXP3 TSDR demethylation status. *Cell Immunol*, 2020. 348: p. 104044.
307. Romano, M., et al., Past, Present, and Future of Regulatory T Cell Therapy in Transplantation and Autoimmunity. *Front Immunol*, 2019. 10: p. 43.
308. Whitehouse, G., et al., IL-2 therapy restores regulatory T-cell dysfunction induced by calcineurin inhibitors. *PNAS USA*, 2017. 114(27): p. 7083-7088.
309. Cao, T., et al., Enhanced suppressive function of regulatory T cells from patients with immune-mediated diseases following successful ex vivo expansion. *Clin. Immunol.*, 2010. 136(3): p. 329-37.
310. 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.
311. Li, C., P.J. Ebert, and Q.J. Li, T cell receptor (TCR) and transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling converge on DNA (cytosine-5)-methyltransferase to control forkhead box protein 3 (foxp3) locus methylation and inducible regulatory T cell differentiation. *J Biol Chem*, 2013. 288(26): p. 19127-39.
312. Wu, Y., et al., FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*, 2006. 126(2): p. 375-87.
313. Wing, K., et al., CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*, 2008. 322(5899): p. 271-5.
314. Fecteau, S., et al., CTLA-4 up-regulation plays a role in tolerance mediated by CD45. *Nat Immunol*, 2001. 2(1): p. 58-63.

315. Uehara, M. and M.M. McGrath, The Role of Costimulatory Pathways in Transplant Tolerance. *Clin Lab Med*, 2019. 39(1): p. 87-106.
316. Nair, V.S., et al., DNA Demethylation of the Foxp3 Enhancer Is Maintained through Modulation of Ten-Eleven-Translocation and DNA Methyltransferases. *Mol Cells*, 2016. 39(12): p. 888-897.
317. Yue, X., et al., Control of Foxp3 stability through modulation of TET activity. *J Exp Med*, 2016. 213(3): p. 377-97.
318. Shi, H., et al., Hippo Kinases Mst1 and Mst2 Sense and Amplify IL-2R-STAT5 Signaling in Regulatory T Cells to Establish Stable Regulatory Activity. *Immunity*, 2018. 49(5): p. 899-914.e6.
319. Shevach, E.M. and A.M. Thornton, tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunol Rev*, 2014. 259(1): p. 88-102.
320. Sebastian, M., et al., Helios Controls a Limited Subset of Regulatory T Cell Functions. *J Immunol*, 2016. 196(1): p. 144-55.
321. Takatori, H., et al., Helios Enhances Treg Cell Function in Cooperation With FoxP3. *Arthritis Rheumatol*, 2015. 67(6): p. 1491-502.
322. Thornton, A.M., et al., Helios(+) and Helios(-) Treg subpopulations are phenotypically and functionally distinct and express dissimilar TCR repertoires. *Eur J Immunol*, 2019. 49(3): p. 398-412.
323. Chen, Y.B., et al., Increased Foxp3(+)/Helios(+) Regulatory T Cells and Decreased Acute Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Bone Marrow Transplantation in Patients Receiving Sirolimus and RGI-2001, an Activator of Invariant Natural Killer T Cells. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2017. 23(4): p. 625-634.
324. Revilla-Nuin, B., et al., Differential profile of activated regulatory T cell subsets and microRNAs in tolerant liver transplant recipients. *Liver Transpl*, 2017. 23(7): p. 933-945.
325. Du, W., et al., Foxp3+ Treg expanded from patients with established diabetes reduce Helios expression while retaining normal function compared to healthy individuals. *PLoS One*, 2013. 8(2): p. e56209.
326. Ouyang, W., et al., Novel Foxo1-dependent transcriptional programs control T(reg) cell function. *Nature*, 2012. 491(7425): p. 554-9.
327. Ochando, J.C., et al., Lymph node occupancy is required for the peripheral development of alloantigen-specific Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol*, 2005. 174(11): p. 6993-7005.
328. Zhang, N., et al., Regulatory T cells sequentially migrate from inflamed tissues to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response. *Immunity*, 2009. 30(3): p. 458-69.
329. Chauhan, S.K., et al., CCL-21 conditioned regulatory T cells induce allotolerance through enhanced homing to lymphoid tissue. *J Immunol*, 2014. 192(2): p. 817-23.
330. Smigiel, K.S., et al., CCR7 provides localized access to IL-2 and defines homeostatically distinct regulatory T cell subsets. *J Exp Med*, 2013. 211(1): p. 121-136.
331. Baecher-Allan, C., E. Wolf, and D.A. Hafler, MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *J Immunol*, 2006. 176(8): p. 4622-31.
332. 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.
333. Kishore, B.K., S.C. Robson, and K.M. Dwyer, CD39-adenosinergic axis in renal pathophysiology and therapeutics. *Purinergic Signal*, 2018. 14(2): p. 109-120.
334. Roberts, V., J. Stagg, and K.M. Dwyer, The Role of Ectonucleotidases CD39 and CD73 and Adenosine Signaling in Solid Organ Transplantation. *Front Immunol*, 2014. 5: p. 64.
335. Zhang, R., et al., An obligate cell-intrinsic function for CD28 in Tregs. *J Clin Invest*, 2013. 123(2): p. 580-93.
336. Rakebrandt, N., K. Littringer, and N. Joller, Regulatory T cells: balancing protection versus pathology. *Swiss Med Wkly*, 2016. 146: p. w14343.
337. Ville, S., et al., Anti-CD28 Antibody and Belatacept Exert Differential Effects on Mechanisms of Renal Allograft Rejection. *J Am Soc Nephrol*, 2016. 27(12): p. 3577-3588.
338. 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.
339. Elkord, E., Frequency of human T regulatory cells in peripheral blood is significantly reduced by cryopreservation. *J Immunol Methods*, 2009. 347(1-2): p. 87-90.
340. Sattui, S., et al., Cryopreservation modulates the detection of regulatory T cell markers. *Cytometry B Clin Cytom*, 2012. 82(1): p. 54-8.
341. Van Hemelen, D., et al., Cryopreservation does not alter the frequency of regulatory T cells in peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol Methods*, 2010. 353(1-2): p. 138-40.
342. Gořab, K., et al., Cell banking for regulatory T cell-based therapy: strategies to overcome the impact of cryopreservation on the Treg viability and phenotype. *Oncotarget*, 2018. 9(11): p. 9728-9740.
343. 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.
344. Cribbs, A.P., et al., Methotrexate Restores Regulatory T Cell Function Through Demethylation of the FoxP3 Upstream Enhancer in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol*, 2015. 67(5): p. 1182-92.

345. Sánchez-Abarca, L.I., et al., Immunomodulatory effect of 5-azacytidine (5-azaC): potential role in the transplantation setting. *Blood*, 2010. 115(1): p. 107-21.
346. Lu, C.H., et al., DNA Methyltransferase Inhibitor Promotes Human CD4(+)CD25(h)FOXP3(+) Regulatory T Lymphocyte Induction under Suboptimal TCR Stimulation. *Front Immunol*, 2016. 7: p. 488.
347. Freudenberg, K., et al., Critical Role of TGF- $\beta$  and IL-2 Receptor Signaling in Foxp3 Induction by an Inhibitor of DNA Methylation. *Frontiers in immunology*, 2018. 9: p. 125-125.
348. Goodyear, O.C., et al., Azacitidine augments expansion of regulatory T cells after allogeneic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 2012. 119(14): p. 3361-9.
349. Costantini, B., et al., The effects of 5-azacytidine on the function and number of regulatory T cells and T-effectors in myelodysplastic syndrome. *Haematologica*, 2013. 98(8): p. 1196-1205.
350. Priyadarssini, M., L. Chandrashekar, and M. Rajappa, Effect of methotrexate monotherapy on T-cell subsets in the peripheral circulation in psoriasis. *Clin Exp Dermatol*, 2019. 44(5): p. 491-497.
351. Gupta, V., et al., CD39 positive regulatory T cell frequency as a biomarker of treatment response to methotrexate in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*, 2018. 21(8): p. 1548-1556.
352. Mikami, N., et al., Epigenetic conversion of conventional T cells into regulatory T cells by CD28 signal deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2020. 117(22): p. 12258-12268.
353. Sun, X., et al., All-Trans Retinoic Acid Induces CD4+CD25+FOXP3+ Regulatory T Cells by Increasing FOXP3 Demethylation in Systemic Sclerosis CD4+ T Cells. *J Immunol Res*, 2018. 2018: p. 8658156.
354. Kasahara, H., et al., Generation of allo-antigen-specific induced Treg stabilized by vitamin C treatment and its application for prevention of acute graft versus host disease model. *Int Immunol*, 2017. 29(10): p. 457-469.
355. Nikolouli, E., et al., Alloantigen-Induced Regulatory T Cells Generated in Presence of Vitamin C Display Enhanced Stability of Foxp3 Expression and Promote Skin Allograft Acceptance. *Frontiers in Immunology*, 2017. 8(748).
356. Sasidharan Nair, V., M.H. Song, and K.I. Oh, Vitamin C Facilitates Demethylation of the Foxp3 Enhancer in a Tet-Dependent Manner. *J Immunol*, 2016. 196(5): p. 2119-31.
357. Chen, S., et al., Epigenetically modifying the Foxp3 locus for generation of stable antigen-specific Tregs as cellular therapeutics. *American Journal of Transplantation*, 2020. 20(9): p. 2366-2379.
358. Okada, M., et al., Stabilization of Foxp3 expression by CRISPR-dCas9-based epigenome editing in mouse primary T cells. *Epigenetics Chromatin*, 2017. 10: p. 24.
359. 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.
360. Arroyo Hornero, R., et al., CD45RA Distinguishes CD4+CD25+CD127-/low TSDR Demethylated Regulatory T Cell Subpopulations With Differential Stability and Susceptibility to Tacrolimus-Mediated Inhibition of Suppression. *Transplantation*, 2017. 101(2): p. 302-309.
361. Canavan, J.B., et al., Developing in vitro expanded CD45RA+ regulatory T cells as an adoptive cell therapy for Crohn's disease. *Gut*, 2016. 65(4): p. 584-94.
362. Nowak, A., et al., CD137+CD154- Expression As a Regulatory T Cell (Treg)-Specific Activation Signature for Identification and Sorting of Stable Human Tregs from In Vitro Expansion Cultures. *Front Immunol*, 2018. 9(199).
363. Arroyo Hornero, R., et al., CD70 expression determines the therapeutic efficacy of expanded human regulatory T cells. *Communications Biology*, 2020. 3(1): p. 375.

## ANEXO I: REACTIVOS

### MEDIO DE EXPANSION SUPLEMENTADO (100 mL):

- L-Glutamina 0,2 M (Gibco) 1 mL
- Piruvato de sodio 100 mM (Gibco) 1 mL
- Antibióticos/Antimicóticos 100x (Gibco) 1 mL
- Suero Humano AB 10 mL
- OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement 2.6 mL
- OpTmizer™ T-Cell Expansion Basal Medium 94.4 mL

### MEDIO RPMI SUPLEMENTADO (100 mL):

- L-Glutamina 0,2 M (Gibco) 1 mL
- Piruvato de sodio 100 mM (Gibco) 1 mL
- Antibióticos/Antimicóticos 100x (Gibco) 1 mL
- Aminoácidos No-Esenciales (Gibco) 1 mL
- Suero Humano AB o SFB 10 mL
- Medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) 86 mL

### PBS 10X (100 mL):

- NaCl 8.0 g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.44 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g
- Ajustar el pH a 7.4 con una solución de HCl o NaOH y aforar a 100 mL con agua destilada

### PBS-p-FORMALDEHÍDO 2% (100 mL):

- p-Formaldehído 2 g
- PBS 1X aforar a 100 mL

Calentar el PBS hasta aproximadamente 56 °C, agregar el p-formaldehído, ajustar el pH a 7.4 con una solución de HCl o NaOH y aforar a 100 mL.

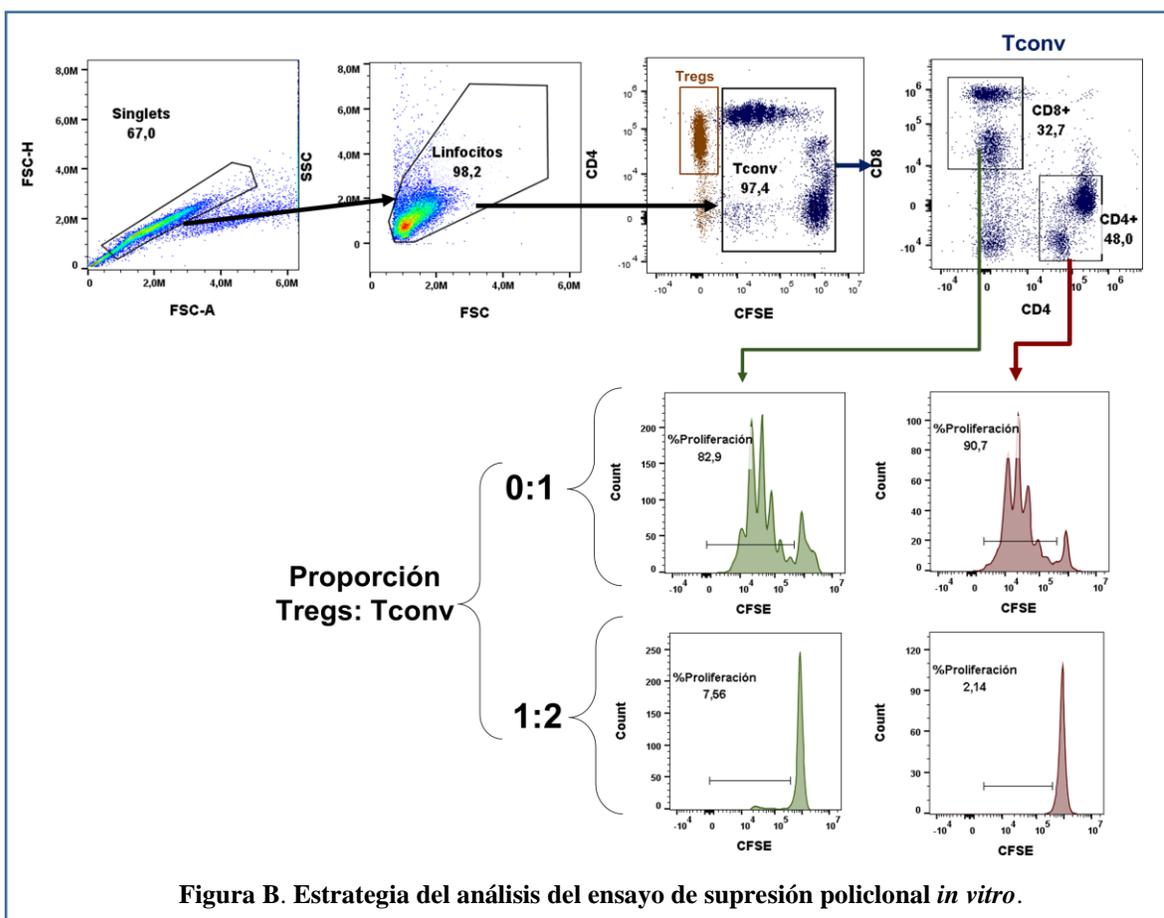
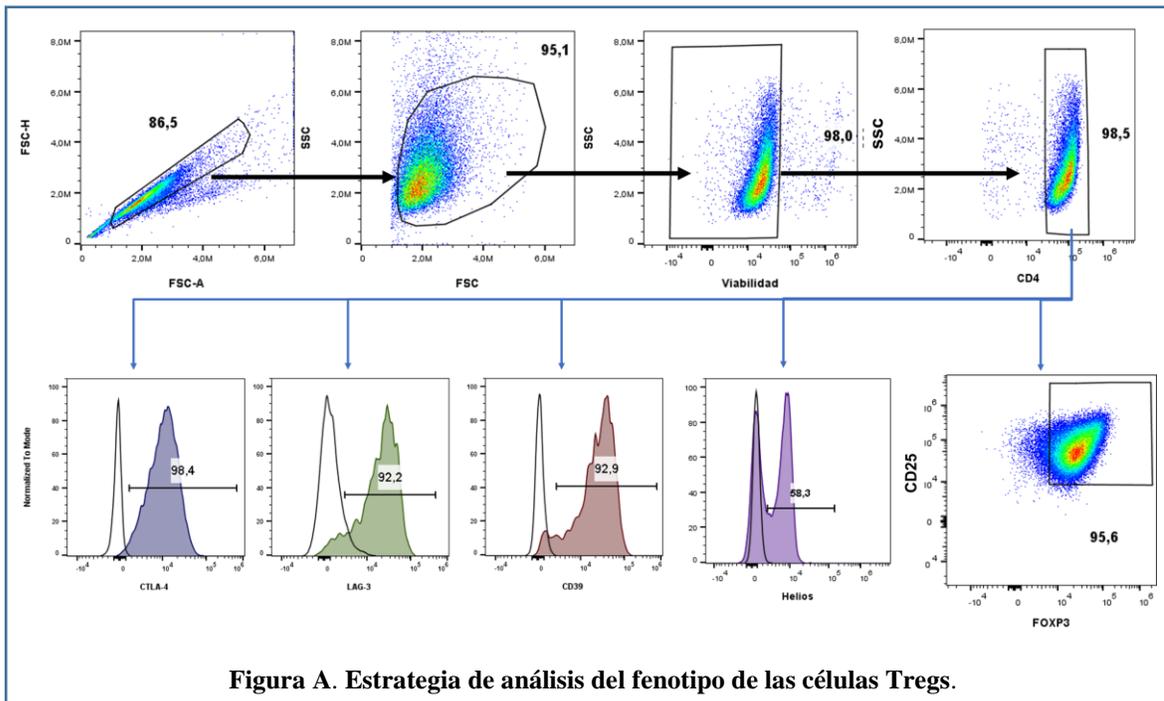
### SOLUCIÓN AMORTIGUADORA MACS (100 mL):

- BSA 0.5 g
- EDTA 0.5 M 0.4 mL
- PBS 1X (pH 7.4) aforar a 100 mL

### SOLUCIÓN AMORTIGUADORA FACS (100 mL):

- Suero fetal bovino 2 mL
- EDTA 0.5 M 0.4 mL
- Azida de Sodio 2.5% 0.4 mL
- PBS 1X 97.2 mL

## ANEXO II: ESTRATEGIAS DE ANÁLISIS PARA CITOMETRÍA DE FLUJO



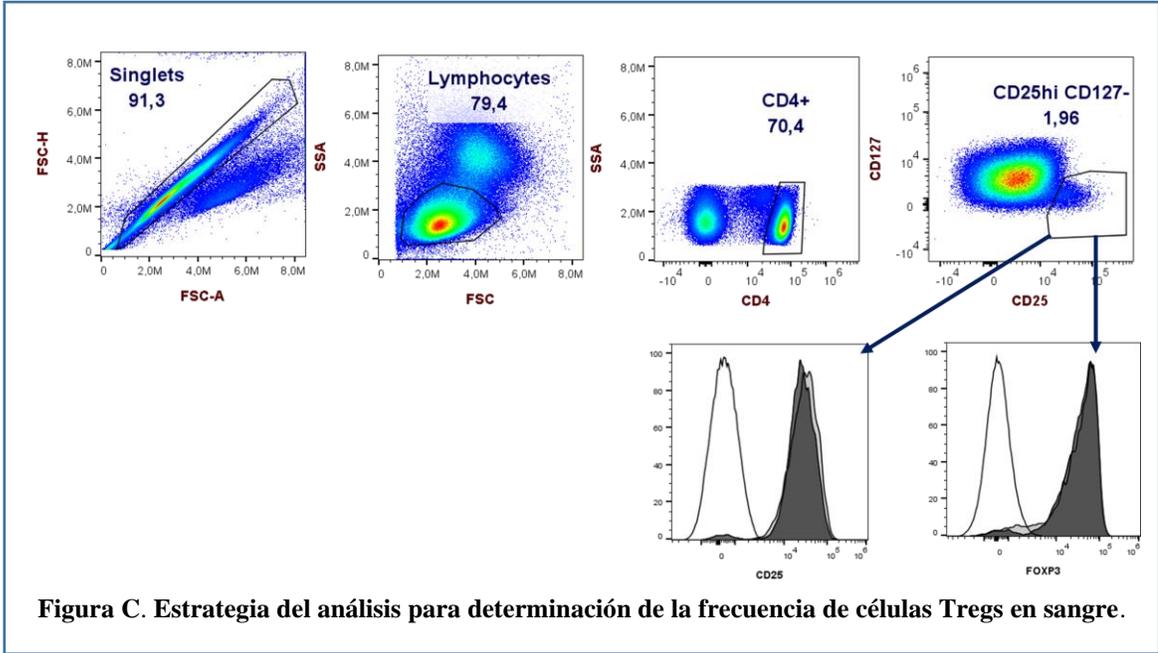


Figura C. Estrategia del análisis para determinación de la frecuencia de células Tregs en sangre.

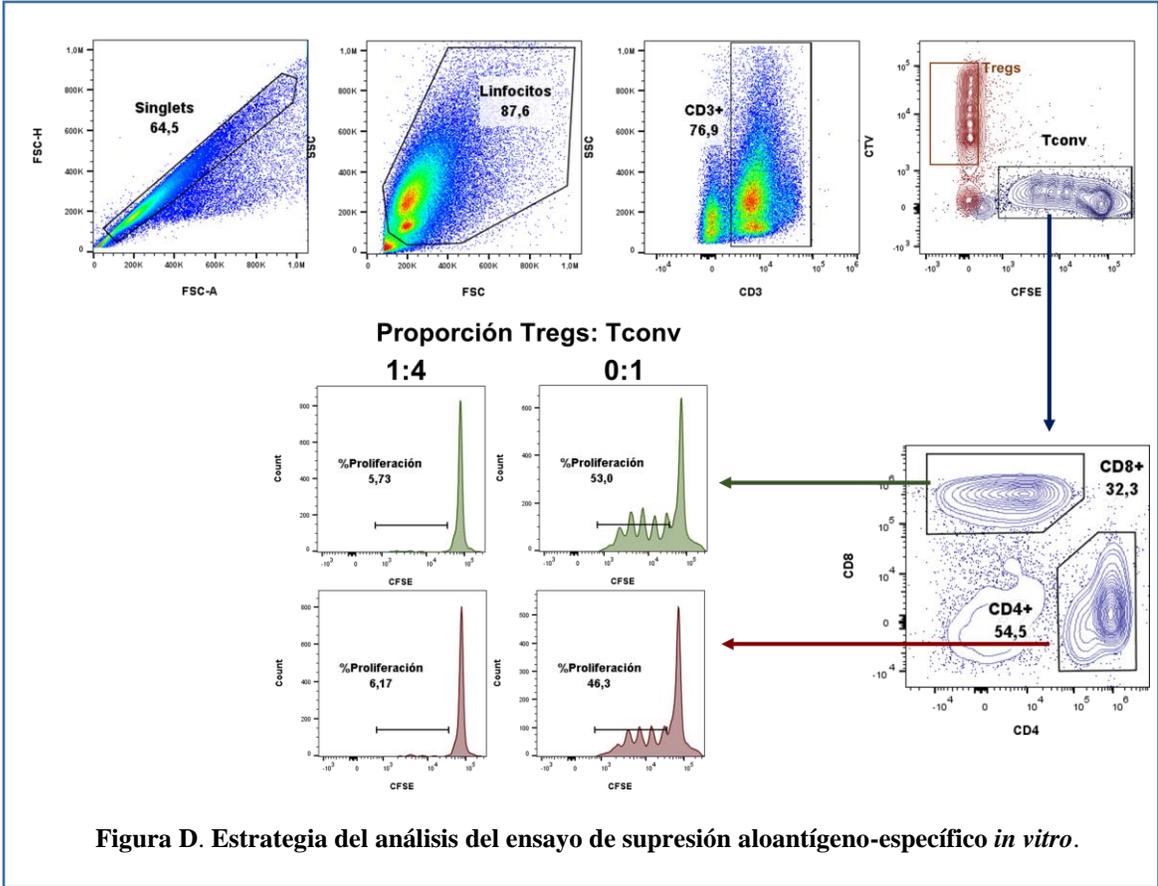


Figura D. Estrategia del análisis del ensayo de supresión aloantígeno-específico *in vitro*.

# ANEXO III: PUBLICACIÓN

Cellular Immunology 348 (2020) 104044



Contents lists available at ScienceDirect

Cellular Immunology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ycimm](http://www.elsevier.com/locate/ycimm)



## Ex vivo expansion of regulatory T cells from long-term Belatacept-treated kidney transplant patients restores their phenotype and suppressive function but not their FOXP3 TSDR demethylation status



A. Cortés-Hernández<sup>a</sup>, E. Alvarez-Salazar<sup>a</sup>, S. Arteaga-Cruz<sup>a</sup>, J. Alberu-Gómez<sup>b</sup>, G. Soldevila<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

<sup>b</sup> Tecnológico de Monterrey, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Ave. Morones Prieto 3000, Monterrey, N.L., México 64710, Mexico

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Kidney transplantation  
Belatacept  
Rapamycin  
Ex vivo expansion  
Regulatory T cells  
TSDR

### ABSTRACT

We recently reported that Tregs from long-term Belatacept-treated kidney transplant patients displayed an altered phenotype and impaired suppressive function compared to Tregs from healthy controls. However, it remains unknown whether *ex vivo* expansion of Tregs from patients who underwent long-term immunosuppression may be feasible to be used in their treatment. In this work, Tregs from Belatacept-treated patients were polyclonally expanded *in vitro* in the presence of rapamycin and IL-2. After four weeks of expansion, Tregs from patients expressed high levels of FOXP3, CD25, CTLA-4, Helios and CCR7, and showed strong suppressive activity, even in the presence of pro-inflammatory cytokines. However, FOXP3 TSDR demethylation remained lower in expanded Tregs from Belatacept-treated patients compared to healthy control Tregs. These data suggest that *ex vivo* expansion of Tregs from patients undergoing long-term immunosuppression may require the use of epigenetic modifying agents to stabilize FOXP3 expression to be considered as treatment in kidney transplant patients.

### 1. Introduction

The use of immunosuppressive drugs such as calcineurin inhibitors (CNIs) is essential to prevent allograft rejection [1]. However, long-term use of these drugs can have deleterious side effects for patients, such as increased cardiovascular risk and nephrotoxicity [2]. Hence, new immunosuppressive drugs have been developed. Belatacept (BLT) is a CTLA4-Ig molecule that blocks T cell costimulation approved in 2011 by the U.S. Food and Drug Administration and the European Medicines Agency for maintenance immunosuppression in kidney recipient patients [3]. Over 7 years, Belatacept-treated kidney transplant recipients enrolled in the Benefit study showed that patient/graft survival and the mean estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR) were significantly higher in Belatacept-treated patients (both the more-intensive regimen and the less-intensive regimen) compared to Cyclosporine A (CsA)-treated patients [4]. However, no statistically significant differences in patient and graft survival were observed between CsA and BLT treated patients; moreover, a higher rate of rejection was noticeable within the first-year post-transplant BLT-treated patients [4,5].

Regulatory T cells (Tregs) have an essential role in establishing and maintaining peripheral tolerance [6]. Tregs are characterized by the

constitutive expression of CD25 and FOXP3, a forkhead transcription factor important in the development and suppressive function of Tregs [6]. Studies conducted with non-human animals have shown that Tregs prevent or delay graft rejection of skin, pancreatic islet, liver, cardiac, kidney and other organ allografts [7–10], supporting the potential role of this cell subpopulation in the maintenance of transplantation tolerance. Therefore, Treg-based immunotherapy is an attractive approach for the treatment of immune disorders as chronic inflammatory diseases, graft-versus-host disease (GvHD) and transplant rejection towards solid organ allografts [11].

One of the main hurdles in the clinical application of Tregs in humans is the limited numbers of these cells in peripheral blood, so *ex vivo* expansion of Tregs has been performed as a method to achieve the required cell numbers for clinical application. Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) was the first model that showed that the adoptive transfer of *ex vivo* expanded Tregs was highly effective in preventing GvHD [12]. Furthermore, several clinical trials have used *ex vivo* expanded Tregs for adoptive cell therapy in bone marrow transplantation in humans. These studies reported a decrease of GvHD severity, which is evidence of the safety and promising efficacy of adoptive Tregs therapy [13–16]. Furthermore, a few studies have

\* Corresponding author.

E-mail address: [soldevi@unam.mx](mailto:soldevi@unam.mx) (G. Soldevila).

<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104044>

Received 29 November 2019; Received in revised form 8 January 2020; Accepted 11 January 2020

Available online 14 January 2020

0008-8749/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

addressed the potential use of Tregs in solid organ transplantation, although some of these clinical trials are still currently ongoing (reviewed in [17]).

One of the main considerations for human Tregs immunotherapy implementation is the potential deleterious effect that immune suppressors can exert on the infused Tregs viability and stability. In this context, several studies have described the effects of immunosuppressive drugs on Tregs homeostasis from kidney transplant patients [18]. We have reported that Tregs from long-term BLT-treated kidney transplant patients displayed both an altered phenotype and decreased *in vitro* function compared to Tregs from healthy controls [19]. However, it remains unknown whether despite these reported alterations in Tregs from patients undergoing long-term immunosuppressive therapy, it is possible to accomplish their *ex vivo* expansion for their use in the induction of allograft tolerance.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Kidney transplanted patients

Nine primary kidney transplant patients included in this sub-study participated in the clinical trial BENEFIT (IM103008 study). All patients received induction therapy with basiliximab. Belatacept was administered at a dose of 5 mg/kg every 4 weeks and the adjunctive maintenance therapy with mycophenolate mofetil and prednisone were daily administered at a dose of 1 g/day and 5 mg/day, respectively.

This sub-study was conducted with authorization of Bristol-Myers Squibb (protocol IM103-351) and approval from the Committees Medical Ethics at the Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM), the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (Reference #1831), the Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, and the Instituto Mexicano de Trasplantes, and performed in accordance with the revised Declaration of Helsinki content, the Declaration of Istanbul, and Good Clinical Practice Guidelines. All patients provided written informed consent to participate in the study. The transplant patients had stable graft function and with no clinical/biochemical evidence of rejection.

Buffy coat preparations of blood from healthy individuals (control group) were provided by the Blood Bank, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México DF.

### 2.2. Reagents and antibodies

For FACS analysis, PECy5 anti-CD25 were obtained from BD Biosciences (San Jose, USA); PE anti-CD4, PECy7 anti-CD8 and Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Kit were from Tonbo Biosciences (San Diego, CA, USA); Alexa Fluor 647 anti-FOXP3 was from Beckman Coulter (Brea, CA USA); PECy7 anti-CTLA-4, APC-Cy7 anti-CCR7 and FITC anti-Helios was from Biolegend (San Diego, CA, USA). Rapamycin and dimethyl sulfoxide (DMSO) were obtained from Sigma-Aldrich (San Luis, MO USA). Recombinant Human IL-2, IL-4, IL-6 and TNF- $\alpha$  cytokines were from PeproTech (New Jersey, NY, USA). Carboxy Fluorescein Succinimidyl Ester (CFSE), Dynabeads Human T-activator CD3/CD28 (anti-CD3/anti-CD28-coated beads), DynaMag-5™ Magnet (DynaMag), CTS™ OpTmizer™ T Cell Expansion SFM medium (Expansion medium), RPMI 1640 medium, Antibiotic-Antimycotic 100 $\times$  and Fetal Bovine Serum (FBS) were obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Human AB pooled sera was from Gemini Bio Products (Sacramento, CA, USA). Lymphoprep was from StemCell Technologies (Vancouver, Canada).

### 2.3. Treg isolation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from the buffy coat preparations of peripheral blood from healthy individuals (CTRL) or peripheral blood from long-term Belatacept-treated renal

transplant recipients (BLT) by density gradient centrifugation over Lymphoprep.

A portion of these PBMCs were resuspended in cold freezing medium (10% DMSO/ 90% FBS) at a concentration of 1 to 10 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/mL, stored for 24 h at  $-70^{\circ}\text{C}$  and then transferred to liquid nitrogen. The cells were thawed in a 37 $^{\circ}\text{C}$  water bath and were collected in RPMI medium supplemented with 20% FBS and washed twice with medium before use in functional assays.

For Tregs isolation, PBMCs were stained with anti-CD4 and anti-CD25 monoclonal antibodies for 20 min at 4 $^{\circ}\text{C}$  in the dark, washed twice with Phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in PBS. A CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> gate was used for sorting Tregs cells using a BD FACSAria I cell sorter (BD). Sorted Tregs cells were collected in RPMI medium with 20% FBS, washed once with culture medium and resuspended in expansion medium for *ex vivo* expansion. An aliquot of sorted subpopulations was stained for FOXP3 to assess the purity of the isolated Tregs (% of CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> among CD4<sup>+</sup> cells).

### 2.4. Ex vivo expansion of Tregs

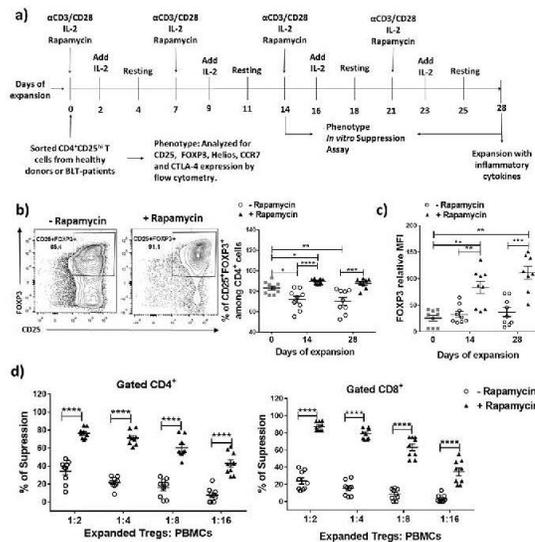
Sorted CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> T cells were cultured in Expansion medium supplemented with 10% human AB serum and IL-2 (300 U/mL); cells were stimulated with anti-CD3/anti-CD28 coated beads in a 1:2 cell to bead ratio in the presence or absence of 100 nM rapamycin for 4 days. On day 2, IL-2 was added (200 U/mL). After 4 days of expansion, the beads were removed with DynaMag, cells were washed twice with culture medium and rested for three days in Expansion medium with IL-2 (50 U/mL) before assays. Three additional rounds of stimulation/resting of 7 days each were performed (Fig. 1a). For stability assays under a pro-inflammatory environment, expanded Tregs were stimulated for an additional round with anti-CD3/anti-CD28 beads (2:1 cell to bead ratio) and 50 U/mL IL-2 in the presence or absence of 5 ng/mL of IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6 or TNF- $\alpha$ .

### 2.5. Surface and intracellular staining

Expanded Tregs were stained with anti-CD25, anti-CTLA-4 and anti-CCR7 monoclonal antibodies for 20 min at 4 $^{\circ}\text{C}$  in the dark and washed twice with FACS buffer. Then, the cells were permeabilized with Fixation/ Permeabilization solution at room temperature for 1 h, washed with Permeabilization buffer 1X and incubated with anti-FOXP3 and anti-Helios for 30 min at 4 $^{\circ}\text{C}$  in the dark, and washed twice with Permeabilization buffer 1X. Samples were acquired on the Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Thermo Fisher Scientific) and data were analyzed with FlowJo vX.0.7 software (Tree Star, Covington, KE, USA). The relative MFI was calculated by dividing the MFI value of the sample by the MFI value of the Fluorescence Minus One (FMO) control.

### 2.6. In vitro suppression assays

Expanded Tregs were co-cultured with autologous PBMCs (labeled with 5  $\mu\text{M}$  CFSE) at several Tregs: PBMCs ratios (0:1, 1:2, 1:4, 1:8 and 1:16) in RPMI medium supplemented with 10% human AB serum and cells were stimulated with anti-CD3/anti-CD28-coated beads (beads:cells ratio of 1:10). For some assays, co-cultures were stimulated in the presence or absence of 5 ng/mL of IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6 or TNF- $\alpha$ . After four days of incubation, co-cultures were stained with anti-CD4 and anti-CD8 for 20 min at 4 $^{\circ}\text{C}$  in the dark and washed twice with FACS buffer. Cells were acquired on the Attune Cytometer and data were analyzed with FlowJo vX.0.7 software. The percentage of proliferation on gated CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells was determined by CFSE dilution and unlabeled CFSE-negative Tregs cells were excluded. The percentage of suppression was calculated using the following formula:



**Fig. 1.** Rapamycin promotes the upregulation of FOXP3 expression and strong *in vitro* suppressive function after *ex vivo* expansion of Tregs from healthy individuals. a) Schematic representation of the protocol used for *ex vivo* expansion of regulatory T cells (Tregs) in the presence or absence of rapamycin. b, c) Tregs from healthy donors expanded in the presence of rapamycin maintain both the proportion of CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> among CD4<sup>+</sup> cells (b) and high levels of FOXP3 (c). d) Tregs expanded in the presence of rapamycin displayed a strong *in vitro* suppressive ability compared to Tregs without rapamycin in all conditions evaluated. A representative experiment on day 28 of expansion is shown (b). The relative median fluorescence intensity (MFI) was calculated as described in materials and methods section 2.5. Results show mean ± SEM. The statistical analysis was performed using the Mann–Whitney U test or Wilcoxon’s rank sum test. Asterisks indicate statistically significant values (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001) compared with the indicated groups.

$$\% \text{ Suppression} = \frac{\text{Proliferation without Treg} - \text{Proliferation with Treg}}{\text{Proliferation without Treg}} \times 100$$

**2.7. DNA methylation analysis of the Treg cell-specific demethylated region (TSDR)**

Genomic DNA extraction and sodium bisulfite modification were performed using the EZ DNA Methylation Direct Kit (Zymo Research Corp., USA) according to the manufacturer’s protocol. The following primers were used for PCR amplification of bisulfite converted genomic DNA: p-5'-GATTTGTTGGGGGTAGAGGATTTAGAGG-3' and o-5'-CATATCACCCACCTAAACCAACCTAC-3'. PCRs were performed on thermocyclers (Thermo Fisher Scientific) in a final volume of 25 µL containing 2.5 µL PCR Buffer 10×, 1 U HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Germany), 200 µM dNTPs, 0.4 µM each of forward and reverse primers, and 10 ng of bisulfite treated genomic DNA. The amplification conditions were 95 °C for 15 min and 35 cycles of 95 °C for 1 min, 62.5 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min, and a final extension step of 10 min at 72 °C. PCR products were purified using QIAEX II gel extraction kit (Qiagen) and were cloned into pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA). DH5α competent cells were transformed with recombinant vector and individual positive bacterial colonies were selected, from which recombinant plasmid DNA was purified using FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit (Favorgen, Pingtung, Taiwan) and sequenced with 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific).

Sequences were analyzed using the MEGA Software v.7.0.26 (Penn State University, USA).

**2.8. Statistics**

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism v7.00 software (San Diego, USA). The Shapiro–Wilk test was used to evaluate the distribution of the data. Paired and unpaired Student t tests were used for comparing normally distributed data; Wilcoxon’s rank sum test or Mann-Whitney test were used for non-normally distributed data. Differences between more than two groups were calculated using the one-way ANOVA or Kruskal–Wallis test for normally or non-normally distributed data, respectively. Graphs are expressed as Mean ± Standard Error of the Mean (SEM). Values with p < 0.05 were considered as statistically significant.

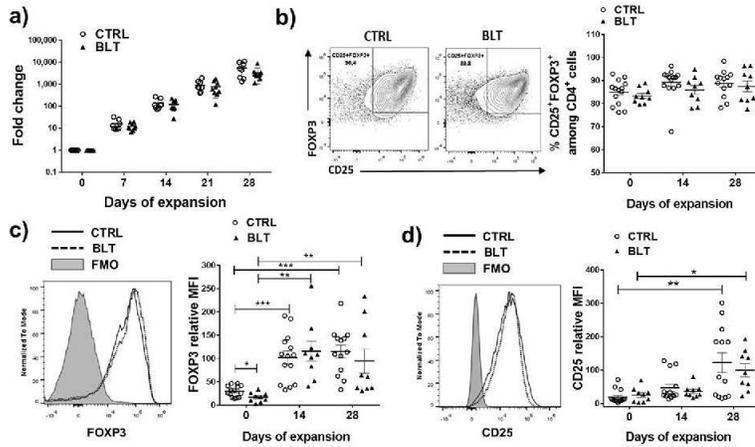
**3. Results**

**3.1. Polyclonal expansion of Tregs with stable phenotype and function**

Based on previous studies, we developed a new protocol for long-term *ex vivo* expansion of Tregs where a 3-day resting period with only IL-2 is introduced into the stimulation cycles with anti-CD3/anti-CD28, in the presence or absence of rapamycin, as inhibition of the PI3K-Akt-mTOR pathway has been shown to promote FOXP3 expression [20–22] (Fig. 1a). Purified CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> T cells from healthy donors expanded for four weeks in the presence of rapamycin (“Rapa-Tregs”) maintained the proportion of CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (Fig. 1b) and enhanced significantly the expression of FOXP3 [relative median fluorescence intensity (MFI)] both at days 14 (Fig. 1c: day 0 = 25.5 ± 15.6 vs day 14 = 83.4 ± 35.0, p < 0.01) and 28 (Fig. 1c: day 0 vs day 28 = 110.9 ± 34.3, p < 0.01) of expansion. In contrast, expansion of Tregs in the absence of rapamycin resulted in a significant decrease in the percentage of CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells at days 14 (Fig. 1b: day 0 = 83.16 ± 5.9 vs day 14 = 71.9 ± 9.9%, p < 0.05) and 28 (Fig. 1b: day 0 vs day 28 = 70.2 ± 11.3, p < 0.01) and no increase in the levels of FOXP3 (Fig. 1c). In addition, Rapa-Tregs displayed a strong *in vitro* suppressive ability compared to Tregs without rapamycin (Fig. 1d) in all conditions evaluated.

**3.2. Expansion of Tregs in the presence of rapamycin successfully restores phenotype of Tregs from long-term BLT-treated patients**

Recently, we reported that Tregs from long-term Belatacept-treated renal receptor patients displayed a significant reduction both in their FOXP3 expression and *in vitro* suppressive capacity compared to Tregs from healthy controls [19]. To investigate whether the *ex vivo* expansion in the presence of rapamycin could enhance the phenotype and function of Tregs from these patients, we expanded CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> T cells from Belatacept-treated patients (BLT) or healthy individuals as control group (CTRL) with anti-CD3/anti-CD28-coated beads in the presence of rapamycin and IL-2. After four weeks of *ex vivo* expansion no significant differences were found in fold expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> T cells from patients compared to healthy controls at all evaluated times (Fig. 2a). Moreover, the initial proportion of CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells (CTRL = 84.9 ± 5.4% and BLT = 83.3 ± 7.1%) in isolated Tregs was similarly maintained in Rapa-Tregs from both groups (Fig. 2b). Although Tregs from BLT patients expressed lower levels of FOXP3 at day 0 (Fig. 2c: CTRL = 29.7 ± 11.8 vs BLT = 16.8 ± 10.0, p < 0.05), this transcription factor was significantly upregulated in healthy controls and BLT Rapa-Tregs both at days 14 (Fig. 2c: CTRL = 102.0 ± 51.8, p < 0.001 and BLT = 115.5 ± 64.5, p < 0.01) and 28 (Fig. 2c: CTRL = 114.9 ± 50.5, p < 0.001 and BLT = 94.5 ± 79.1, p < 0.01) of expansion. In addition, CD25 levels were significantly increased in Rapa-Tregs from both groups at day 28 of culture (Fig. 2d: CTRL day 0 = 19.0 ± 20.3 vs CTRL day 28 = 122.7 ± 105.2,



**Fig. 2.** Ex vivo expanded Tregs cells from long-term BLT-treated kidney transplanted patients increase the FOXP3 and CD25 expression. a–d) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> T cells from BLT-treated transplanted patients (BLT, black triangles) or healthy controls (CTRL, white circles) were *in vitro* expanded in the presence of rapamycin for four weeks. The expression of CD25 and FOXP3 were determined on days 0, 14 and 28 of ex vivo expansion by flow cytometry. a and b) The fold expansion (a) and proportion of CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> among CD4<sup>+</sup> cells (b) were similar between Tregs from BLT-treated patients and healthy controls. c–d) Relative MFIs of FOXP3 (c) and CD25 (d) were significantly upregulated at day 28 of expansion in Tregs from both groups. Representative experiments on day 28 of expansion of Tregs from BLT patients and healthy individuals are shown (b, c, and d), and the gray histograms represents Fluorescence Minus One (FMO). The relative median fluorescence intensity (MFI) was calculated as described in materials and methods section 2.5. Results are shown as mean  $\pm$  SEM. The statistical analysis was performed

using the Mann–Whitney *U* test or Wilcoxon's rank sum test. Asterisks indicate statistically significant values (\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001) compared with the indicated groups.

*p* < 0.01; BLT day 0 = 25.0  $\pm$  22.0 vs BLT day 28 = 99.8  $\pm$  59.7, *p* < 0.05).

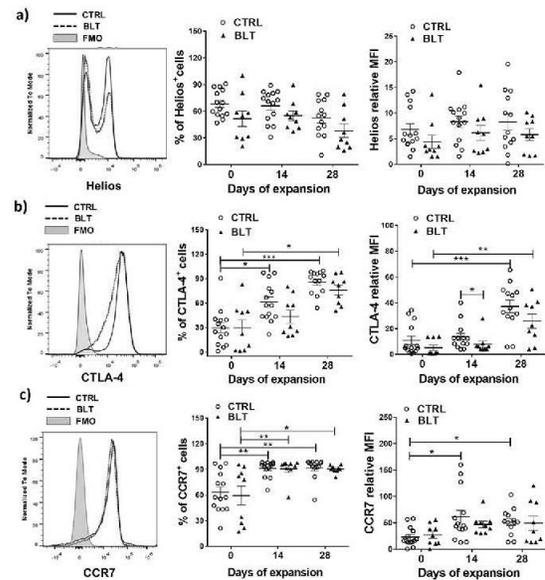
After successful expansion of Tregs from BLT-treated patients and healthy individuals, we subsequently investigated the expression of selected Tregs markers including Helios, CTLA-4 and CCR7. Helios is a member of the Ikaros transcription factor family, and a study demonstrate that it is required to maintain a stable suppressor function in Tregs [23]. As shown in Fig. 3a, the proportion of Helios<sup>+</sup> cells was similar in Rapa-Tregs from both BLT-treated patients and healthy controls and expression of this transcription marker was maintained after 28 days of ex vivo expansion.

CTLA-4 is a co-inhibitory receptor that interacts with CD80 and CD86 expressed on antigen presenting cells and plays a key role in contact-dependent Treg mediated immunosuppression by blocking T cell costimulation [24]. Our data showed a significant increase in the frequency of CTLA-4<sup>+</sup> cells (Fig. 3b: CTRL day 0 = 29.6  $\pm$  23.0 vs CTRL day 28 = 86.0  $\pm$  14.1%, *p* < 0.001; BLT day 0 = 29.8  $\pm$  29.0 vs BLT day 28 = 76.0  $\pm$  17.7%, *p* < 0.05) and upregulation of CTLA-4 expression (Fig. 3b: CTRL day 0 = 10.8  $\pm$  12.2 vs CTRL day 28 = 37.2  $\pm$  17.8, *p* < 0.001; BLT day 0 = 5.15  $\pm$  6.3 vs BLT day 28 = 25.6  $\pm$  16.6, *p* < 0.01) in Tregs from BLT and control individuals after *in vitro* expansion.

The CC-chemokine receptor 7 (CCR7) is involved in lymph-node homing of naïve T cells and Tregs, contributing to both immunity and tolerance [25]. Long-term Rapa-Tregs from BLT-treated and controls showed a high proportion of CCR7<sup>+</sup> cells (Fig. 3c: CTRL day 0 = 63.5  $\pm$  23.4 vs CTRL day 28 = 91.8  $\pm$  12.2%, *p* < 0.01; BLT day 0 = 59.4  $\pm$  33.4 vs BLT day 28 = 90.5  $\pm$  4.4%, *p* = 0.027) and CCR7 expression (Fig. 3c).

### 3.3. Rapamycin enhances the suppressive function of expanded Tregs from long-term BLT-treated patients

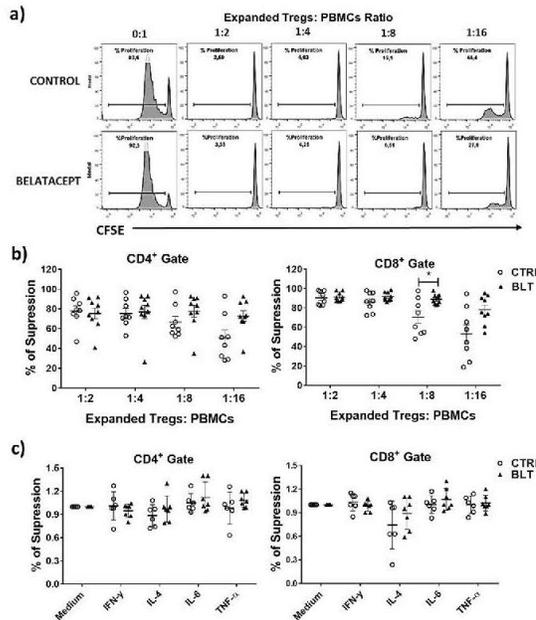
To evaluate whether the restored Tregs phenotype observed after ex vivo expansion in the presence of rapamycin resulted in enhanced functional capacity of these cells, we performed *in vitro* suppression assays with Rapa-Tregs from BLT patients or controls individuals. Tregs from BLT-treated patients expanded with rapamycin for 14 days (not shown) and 28 days suppressed the proliferation of both autologous CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells to a similar extent than Tregs from healthy controls at all evaluated ratios (Fig. 4a and b).



**Fig. 3.** Rapamycin promotes the maintenance of Helios expression and the upregulation of both CTLA-4 and CCR7 expression in expanded Tregs from BLT-patients. a–c) Analysis typical Tregs markers showed maintenance both in the percentage and MFI of Helios (a), as well as an increase in the CTLA-4 (b) and CCR7 (c) expression in Tregs from BLT patients (BLT, black triangles) and healthy controls (CTRL, white circles) after long-term ex vivo expansion. Representative experiments on day 28 of expansion are shown (a, b, and c), and the gray histograms represents Fluorescence Minus One (FMO). The relative median fluorescence intensity (MFI) was calculated as described in materials and methods section 2.5. Results are expressed as mean  $\pm$  SD. The statistical analysis was performed using the Mann–Whitney *U* test or Wilcoxon's rank sum test. Asterisks indicate statistically significant values (\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001) compared with the indicated groups.

### 3.4. Ex vivo expanded Tregs from long term BLT treated patients maintain a stable suppressive function in a pro-inflammatory microenvironment

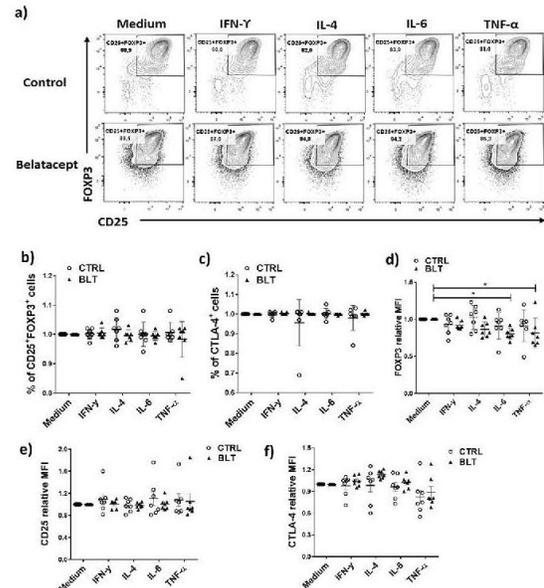
To evaluate the functional stability of expanded Tregs under an



**Fig. 4.** Tregs from BLT-treated kidney transplanted patients expanded in the presence of rapamycin displayed a strong *in vitro* suppressive function. On day 28, the suppressive effect of expanded Tregs was determined by measuring the inhibition of proliferation of CFSE-labeled T cells in co-culture with expanded Tregs from BLT-treated patients (BLT, black triangles) or healthy controls (CTRL, white circles). a) A representative experiment on day 28 of expansion is shown. b) Tregs from patients had a high suppressive capacity of both CD4<sup>+</sup> (left) and CD8<sup>+</sup> (right) T cells proliferation at all evaluated conditions. c) On day 28, *in vitro* suppression assays were performed in the presence of IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6 or TNF- $\alpha$ . Expanded Tregs from both patients and healthy controls maintained their capacity to effectively suppress both CD4<sup>+</sup> (left) and CD8<sup>+</sup> (right) T cell proliferation in the presence of inflammatory cytokines. Results are shown as mean  $\pm$  SEM. The statistical analysis was performed using the Mann-Whitney *U* test or one-way ANOVA test. Asterisks indicate statistically significant values (\**p* < 0.05) compared with the indicated groups.

inflammatory microenvironment, we performed *in vitro* suppression assays in the presence of IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6 or TNF- $\alpha$ , as described above. Our data showed that Rapa-Tregs from BLT-treated patients inhibited the proliferation of both autologous CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in the presence of all cytokines evaluated to the same extent as Tregs from healthy controls (Fig. 4c).

To further analyze Tregs stability we next evaluated the effect of an inflammatory microenvironment on the phenotype of Rapa-Tregs after an additional week of expansion in the presence of IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6 or TNF- $\alpha$ . Rapa-Tregs from BLT-treated patients maintained the proportion of CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (Fig. 5a and b) and CTLA-4<sup>+</sup> (Fig. 5c) cells similarly to Tregs from healthy controls in all conditions evaluated. Additionally, FOXP3 expression did not significantly decrease in Rapa-Tregs from both groups when expanded in the presence of IFN- $\gamma$  and IL-4 (Fig. 5d). However, when Rapa-Tregs were stimulated with IL-6 or TNF- $\alpha$ , levels of FOXP3 were significantly decreased only in expanded Tregs from BLT-patients (Fig. 5d). In contrast, CTLA-4 and CD25 expression did not significantly decrease in neither Tregs from healthy controls nor in BLT patients after expansion in the presence of pro-inflammatory cytokines (Fig. 5e and f).



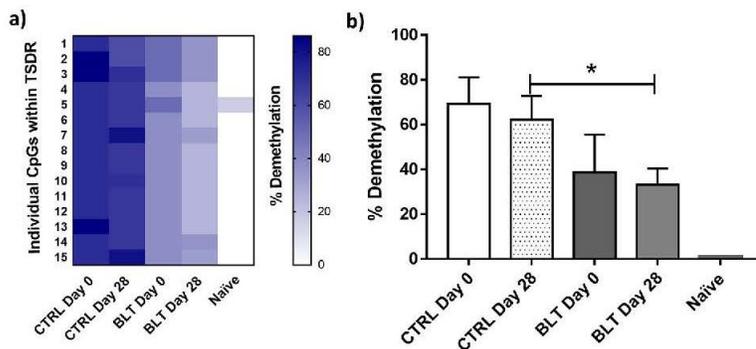
**Fig. 5.** *Ex vivo* expanded Tregs from BLT-treated patients decrease FOXP3 levels under a pro-inflammatory environment. a-f) Expanded Tregs from patients (BLT, black triangles) and healthy controls (CTRL, white circles) were stimulated with anti-CD3/anti-CD28-coated beads and IL-2 in the presence or absence of IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6 or TNF- $\alpha$ . On day 7, the expression of CD25 and FOXP3 were determined by flow cytometry. a) A representative experiment is shown. b-d) Activation of expanded Tregs from BLT-treated patients in the presence of inflammatory cytokines did not have an effect on the percentage of CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells (b) and CTLA-4<sup>+</sup> cells (c) similar to Tregs from controls. d) No significant change in FOXP3 expression (relative MFI) was detected when the expanded Tregs were activated in the presence of IFN- $\gamma$  and IL-4, but this expression significantly decreased in the presence of IL-6 and TNF- $\alpha$  only in the Tregs from patients. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. The statistical analysis was performed using the one-way ANOVA test. Statistical significance is indicated as \**p* < 0.05.

### 3.5. *Ex vivo* expansion of Tregs in the presence of rapamycin does not restore the demethylation profile of BLT Tregs

Finally, to evaluate whether the observed stability in Rapa-Tregs was associated to their epigenetic status we evaluated the demethylation of TSDR FOXP3. As we had previously reported, the percentage of demethylation in the TSDR of FOXP3 locus was lower in the recently purified Tregs from patients (39%) compared to healthy controls (69%) (Fig. 6a and b). At the end of *ex vivo* expansion, DNA demethylation in the FOXP3 TSDR was lower in Tregs from patients (32%) compared to Tregs from healthy individuals (62%) (Fig. 6a and b).

## 4. Discussion

Treg-based therapy has been limited by the fact that FOXP3<sup>+</sup> Tregs represent less than 10% of CD4<sup>+</sup> T cells in peripheral blood. Therefore, researchers have designed protocols to isolate, expand and preserve Tregs to achieve the cell numbers needed for effective immunotherapy. Several reports have shown successful expansion of Tregs from healthy individuals under different methodological settings (reviewed in [26]). On the other hand, a recent report showed that isolation and expansion of Tregs is feasible in kidney transplanted patients undergoing immunosuppression [27]. However, it is currently unknown whether expanded Tregs from transplanted patients under long-term



**Fig. 6.** *Ex vivo* expansion does not restore the demethylation profile of Tregs from BLT-treated patients. CpG methylation analysis of TSDR region in FOXP3 gene was evaluated from proliferating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> cells before (Day 0) and after 4 weeks of expansion. (A) Each square represents one CpG site analyzed. Methylation color code ranges from white (0% demethylation) to blue (100% demethylation) according to the color scale. Naïve T cells display a completely methylated TSDR and were used as negative control. (B) Freshly isolated Tregs from patients display partial demethylation of FOXP3 TSDR region ( $\approx$  39%) while Tregs expanded for 4 weeks, show no significant changes in the demethylation of the TSDR CpG islands. Data are expressed as mean of the percentage of demethylation  $\pm$  SEM. The statistical analysis was performed using the Student's *t*-test two tails. Statistical significance is indicated as \**p* < 0.05. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

immunosuppressive therapy (> 6 months) can give rise to functionally stable Tregs. In this context, we have recently reported that Tregs from long-term BLT-treated kidney receptor patients exhibited increased methylation of CpG islands within the *Foxp3* TSDR, which was associated with decreased levels of FOXP3 and CD25, resulting in impaired suppressive function [19].

Recent data has shown that IL-2 can restore Tregs viability in liver transplanted patients maintained under CNI treatment [28]. Also, expanded Tregs from patients with different immune mediated diseases displayed potent and enhanced *in vitro* suppressive activity on T effector cell proliferation compared to freshly purified Tregs cells from the same patients [29]. Here, we hypothesized that functionally impaired Tregs from long-term BLT patients, display a functional defect, as a result of long-term exposure to an altered cytokine milieu and/or defective signaling caused by the costimulatory block, that could be reversibly after *ex vivo* expansion. Therefore, we attempted to establish an optimized protocol of Tregs expansion aiming to restore the normal phenotype and function of Tregs from kidney transplanted patients undergoing BLT treatment, that could be used for immunotherapy.

Most of the reported protocols for *ex vivo* expansion have been performed after stimulation with anti-CD3 plus anti-CD28 stimulation in the presence of IL-2 [26]; however, chronic TCR stimulation of Tregs has been shown to cause a decrease in FOXP3 expression and suppressive function [30]. The method described here was efficient to minimize the potential Tregs instability induced by repetitive TCR stimulation. Consistent with several studies [20–22,31,32], expansion of Tregs in the presence of rapamycin (Rapa-Tregs) resulted in increased expression of Tregs markers including FOXP3, CD25 and CTLA-4, which correlated with enhanced suppressive function when compared to non-rapamycin treated Tregs (Fig. 1).

Therefore, this protocol was subsequently applied to Tregs from BLT patients. Interestingly, Tregs from BLT-treated patients could also be efficiently expanded in the presence of rapamycin, similarly to Tregs from healthy controls. These results indicate that despite the reported alterations in Tregs from patients undergoing long-term immunosuppressive therapy, Tregs do not have an intrinsic defect in their proliferative capacity. Notably, Rapa-Tregs from BLT-treated patients displayed similar features to Tregs from healthy controls, including the increase of FOXP3, CD25 and CTLA-4 expression. The molecular mechanisms underlying the positive effect of rapamycin during Tregs expansion include the increase of Pim-2, which confers a proliferative advantage over conventional T cells [31,33] and the upregulation of PTEN, a phosphatase that downregulates PI3K/Akt/mTOR pathway, which is important in Tregs (reviewed in [34]) to allow the nuclear translocation of FoxO1 and FoxO3 proteins which bind to *Foxp3* locus

and cooperatively upregulate FOXP3 expression [35,36].

Phenotypic analysis showed that Rapa-Tregs from BLT-treated patients displayed an increase in the expression of CD25 and CTLA-4, in agreement with the increased expression of FOXP3, which directly upregulates the transcription of both molecules by binding to *Il2ra* and *Ctla4* locus [37]. This is functionally relevant as CTLA-4 expression in Tregs is critical to suppress allogeneic T cell proliferation and induce long-term graft survival [38–41]. On the other hand, CD25 expression is essential to promote stable FOXP3 expression in Tregs, through facilitating Stat5 binding to the *Foxp3* locus and favoring IL-2 consumption to restrain conventional T cell proliferation [42].

Interestingly, Rapa-Tregs from both BLT patients and healthy individuals displayed high expression of CCR7, a chemokine receptor responsible for T cell homing to secondary lymphoid organs [25]. Although CCR7 expression is downregulated in conventional T cells upon activation [43], it was reported that expression of FoxO1 in Tregs controls T cell migration by promoting *Ccr7* gene transcription [44]. Indeed, data from animal models of allotransplantation suggest that CCR7 plays a critical role in Tregs-mediated immune suppression, through regulating Tregs homing to graft [45,46,47] and positioning to defined functional niches in the draining lymph nodes [48].

Additionally, Rapa-Tregs from both BLT-patients and healthy controls maintained the expression of Helios, a member of the Ikaros gene transcription factor family that is expressed in a subset of FOXP3<sup>+</sup> Tregs [49]. Studies have described that Helios expression is required in Tregs to induce the expression of Tregs-related genes [50], enhance suppressive function [51], promote Tregs-survival [23] and maintain a stable phenotype during inflammatory responses [52]. Additionally, the increased Helios<sup>+</sup> Tregs correlated with a good allograft outcome in humans [53,54]. Interestingly, a recent paper has described that expanded FOXP3<sup>+</sup> Tregs from diabetic patients may retain normal suppressive function despite their reduced Helios expression, suggesting that this marker may not necessarily define the functional status of the cell [55].

Previously, we showed that peripheral blood Tregs from BLT-treated kidney receptor patients displayed a reduction of *in vitro* suppressive function [19]. Interestingly, Tregs from BLT-patients expanded in the presence of rapamycin enhanced their *in vitro* suppressive function to a similar extent than Tregs from healthy controls, in agreement with the increased levels of FOXP3, CD25 and CTLA-4. These results suggest that altered function of Tregs from BLT-treated patients could be due to defective CD28-dependent signaling, as a result of costimulatory block therapy. Indeed, CD28 was shown to promote FOXP3 expression through the activation of NF- $\kappa$ B [56]. Moreover, it was demonstrated that CD28 signaling is crucial for optimal *in vitro* function of Tregs, as

conditional deletion of *Cd28* in Tregs resulted in severe autoimmunity as a consequence impaired Treg proliferation and survival, as well as altered expression of CTLA-4 and PD-1 [57]. Alternatively, blocking of CTLA-4 on Tregs may reduce their ability cells downregulate DC function, favoring the development of autoimmunity [38].

One major concern regarding the use of Tregs for immunotherapy is the risk of their conversion into effector cells and the loss of the suppressive activity during inflammatory responses [58]. In this regard, it is crucial to evaluate Treg stability previous to their clinical application. In an attempt to investigate whether Rapa-Tregs would be functional under pro-inflammatory conditions, *in vitro* suppression assays were performed in the presence of IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-4 and IFN- $\gamma$ . Our results showed that Rapa-Tregs from BLT-treated patients inhibited T cell proliferation in the presence of pro-inflammatory cytokines to the same extent as Tregs from healthy controls. However, when Rapa-Tregs were expanded for an additional week in the presence of the above mentioned cytokines, the levels of FOXP3 were diminished only in Tregs from BLT patients cultured with IL-6 and TNF- $\alpha$ . This is in agreement with reports showing that IL-6 [59] and TNF- $\alpha$  [60] can trigger FOXP3 degradation. These data indicate that Tregs from BLT patients may be less stable under pro-inflammatory conditions, which suggested possible differences in the epigenetic status *Foxp3* gene [61].

Stability of FOXP3 expression has been shown to correlate with complete demethylation of the Treg cell-specific demethylated region (TSDR) within the *Foxp3* locus [62]. As previously reported Tregs from long-term BLT-treated patients show increased TSDR methylation [19]. In contrast, inhibition of only CD28 in a primate transplant model, did not induced decreased TSDR demethylation compared to BLT treatment [63]. When we analyzed the methylation status of FOXP3 TSDR from long-term expanded Tregs, we found that Rapa-Tregs from BLT-patients maintained lower TSDR demethylation compared to Rapa-Tregs from healthy individuals (Fig. 6b). Therefore, the increase in FOXP3 expression and the strong suppressive activity of Rapa-Tregs from BLT patients did not correlate with changes in the epigenetic status of the *Foxp3* locus, suggesting that other molecular mechanisms may explain the functionality of these cells. In this context, it was reported that hypomethylation and Treg lineage acquisition are independent of FOXP3 expression [64]. Furthermore, we cannot rule out the possibility of other epigenetic mechanisms being involved in Treg identity and/or stability, such as histone modifications, nucleosome positioning and miRNA regulation [65,66].

In summary, we demonstrate that *in vitro* expansion of Tregs from long-term treated BLT-patients in the presence of rapamycin, is able to restore their reported altered phenotype and function although FOXP3 stability may be impaired under a pro-inflammatory microenvironment. Interestingly, Tregs from rheumatoid arthritis patients showed impaired suppressive function that could be restored after treatment with methotrexate, as a result of induced demethylation of the *Foxp3* TSDR [67]. We propose that other agents may need to be included in the expansion protocol to ensure Treg stability for immunotherapy purposes. In this context, recent reports have shown that it is possible to increase the demethylation status of the TSDR region in induced Tregs by adding vitamin C, an activator of TET enzymes, which controls the stability of FOXP3 [68].

#### Conflict of interest

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose.

#### Funding

This study was supported by CONACyT Grant #272518. EAS was a student of the PhD program: Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and a recipient of a doctoral fellowship from CONACyT (#508108). ACH is a student of the

PhD program: Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México and is supported by a fellowship from CONACyT (#549444).

#### CrediT authorship contribution statement

**A. Cortés-Hernández:** Investigation, Methodology, Formal analysis, Writing - original draft. **E. Alvarez-Salazar:** Investigation, Methodology, Writing - review & editing. **S. Arteaga-Cruz:** Investigation. **J. Alberú-Gómez:** Resources, Writing - review & editing. **G. Soldevila:** Conceptualization, Funding acquisition, Resources, Supervision, Writing - review & editing.

#### Acknowledgments

The authors thank the LabNalCit-UNAM (CONACyT) for the technical support in the sorting of flow cytometry samples. The authors also thank the Blood Bank of Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias and Aurora Casillas Abundis from Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición for providing control blood samples. Finally, we would like to thank Jesus Rafael Rodríguez-Aguilera from Instituto de Fisiología Celular-UNAM, for his technical assistance.

#### References

- [1] F. Casiraghi, M. Cortinovis, N. Perico, G. Remuzzi, Recent advances in immunosuppression and acquired immune tolerance in renal transplants, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **310** (2016) F446–F453, <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00312.2015>.
- [2] A. Reske, A. Reske, M. Metzke, Complications of immunosuppressive agents therapy in transplant patients, *Minerva Anestesiol.* **81** (2015) 1244–1261.
- [3] D. Kumar, S. LeCorchick, G. Gupta, Belatacept As an alternative to calcineurin inhibitors in patients with solid organ transplants, *Front. Med.* **4** (2017) 60, <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00060>.
- [4] F. Vincenti, L. Rostaing, J. Grinyo, K. Rice, S. Steinberg, L. Gaithe, M.C. Moal, G.A. Mondragon-Ramirez, J. Kothari, M.S. Polinsky, H.U. Meier-Kriesche, S. Munier, C.P. Larsen, Belatacept and long-term outcomes in kidney transplantation, *N. Engl. J. Med.* **374** (2016) 333–343, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1506027>.
- [5] F. Vincenti, B. Charpentier, Y. Vanrenterghem, L. Rostaing, B. Bresnahan, P. Darji, P. Massari, G.A. Mondragon-Ramirez, M. Agarwal, G. Di Russo, C.S. Lin, P. Garg, C.P. Larsen, A phase III study of belatacept-based immunosuppression regimens versus cyclosporine in renal transplant recipients (BENEFIT study), *Am. J. Transplant.* **10** (2010) 535–546, <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.03005.x>.
- [6] L. Lu, J. Barbi, F. Pan, The regulation of immune tolerance by FOXP3, *Nat. Rev. Immunol.* **17** (2017) 703–717, <https://doi.org/10.1038/nri.2017.75>.
- [7] L.-Y. Pu, X.-H. Wang, F. Zhang, X.-C. Li, A.-H. Yao, Y. Yu, L. Lv, G.-Q. Li, Adoptive transfusion of ex vivo donor alloantigen-stimulated CD4(+)CD25(+) regulatory T cells ameliorates rejection of DA-to-Lewis rat liver transplantation, *Surgery* **142** (2007) 67–73, <https://doi.org/10.1016/j.surg.2007.02.014>.
- [8] O. Joffre, T. Santolaria, D. Calise, T. Al Saati, D. Hudrisier, P. Romagnoli, J.P.M. van Meerwijk, Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes, *Nat. Med.* **14** (2008) 88–92, <https://doi.org/10.1038/nm1688>.
- [9] M. Hu, C. Wang, G.Y. Zhang, M. Saito, Y.M. Wang, M.A. Fernandez, Y. Wang, H. Wu, W.J. Hawthorne, C. Jones, P.J. O'Connell, T. Sparwasser, G.A. Bishop, A.F. Sharland, S.I. Alexander, Infiltrating Foxp3(+) regulatory T cells from spontaneously tolerant kidney allografts demonstrate donor-specific tolerance, *Am. J. Transplant.* **13** (2013) 2819–2830, <https://doi.org/10.1111/ajt.12445>.
- [10] F. Xiao, L. Ma, M. Zhao, G. Huang, V. Miranda, A. Dodling, R. Lechler, G. Lombardi, Ex vivo expanded human regulatory T cells delay islet allograft rejection via inhibiting islet-derived monocyte chemoattractant protein-1 production in CD34+ stem cells-reconstituted NOD.scid IL2rgamma null mice, *PLoS ONE* **9** (2014) e90387, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090387>.
- [11] B.D. Singer, L.S. King, F.R. D'Alesio, Regulatory T cells as immunotherapy, *Front. Immunol.* **5** (2014) 46, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00046>.
- [12] J.L. Cohen, A. Trenado, D. Vasey, D. Klatzmann, B.L. Salomon, CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease, *J. Exp. Med.* **196** (2002) 401–406.
- [13] P. Trzonkowski, M. Bieniaszewska, J. Juscinska, A. Dobyszuk, A. Krzystyniak, N. Marek, J. Mysliwska, A. Hellmann, 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.* **133** (2009) 22–26, <https://doi.org/10.1016/j.clim.2009.06.001>.
- [14] C.G. Brunstein, J.S. Miller, Q. Cao, D.H. McKenna, K.L. Hippen, J. Curtsinger, T. DeFor, B.L. Levine, C.H. June, P. Rubinstein, P.B. McGlave, B.R. Blazar, J.E. Wagner, Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted

- with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics, *Blood* 117 (2011) 1061–1070, <https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-293795>.
- [15] M.F. Martelli, M. Di Ianni, L. Ruggeri, F. Falzetti, A. Carotti, A. Terenzi, A. Pierini, M.S. Massei, L. Amico, E. Urbani, B. Del Papa, T. Zei, R. Iacucci Ostini, D. Cecchini, R. Tognellini, Y. Reisman, F. Aversa, B. Falini, A. Velardi, HLA-haploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse, *Blood* 124 (2014) 638–644, <https://doi.org/10.1182/blood-2014-03-564401>.
- [16] C.G. Brunstein, J.S. Miller, D.H. McKenna, K.L. Hippen, T.E. DeFor, D. Sumstad, J. Curtsinger, M.R. Verneris, M.L. MacMillan, B.L. Levine, J.L. Riley, C.H. June, C. Le, D.J. Weisdorf, P.B. McGlave, B.R. Blazar, J.E. Wagner, Umbilical cord blood-derived T regulatory cells to prevent GVHD: kinetics, toxicity profile, and clinical effect, *Blood* 127 (2016) 1044–1051, <https://doi.org/10.1182/blood-2015-06-653667>.
- [17] T. Valkunthanathan, N. Saffinia, D. Boardman, R.I. Lechler, G. Lombardi, Regulatory T cells: tolerance induction in solid organ transplantation, *J. Clin. Exp. Immunol.* 189 (2017) 197–210, <https://doi.org/10.1111/cei.12978>.
- [18] A. Furukawa, S.A. Wisel, Q. Tang, Impact of immune-modulatory drugs on regulatory T cell, *Transplantation* 100 (2016) 2288–2300, <https://doi.org/10.1097/tp.0000000000001379>.
- [19] E.K. Alvarez Salazar, A. Cortés-Hernández, G.R. Alemán-Muench, J. Alberú, J.R. Rodríguez-Aguilera, F. Recillas-Targa, V. Chagoya de Sánchez, E. Cuevas, E. Mancilla-Urrea, M. Pérez García, G. Mondragón-Ramírez, M. Vilatobá, I. Bostock, E. Hernández-Méndez, D. De Rungs, E.A. García-Zepeda, G. Soldevila, Methylation of FOXP3 TSDR underlies the impaired suppressive function of tregs from long-term belatacept-treated kidney transplant patients, *Front. Immunol.* 8 (2017) 219, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00219>.
- [20] E. Tresoldi, I. Dell'Albani, A. Stablini, T. Jofra, A. Valle, N. Gagliani, A. Bondanza, M.G. Roncarolo, M. Battaglia, Stability of human rapamycin-expanded CD4+CD25+ T regulatory cells, *Haematologica* 96 (2011) 1357–1365, <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.041483>.
- [21] C. Scotta, M. Esposito, H. Fazekasova, G. Fanelli, F.C. Edozie, N. Ali, F. Xiao, M. Peakman, B. Afzali, P. Sagoo, R.I. Lechler, G. Lombardi, Differential effects of rapamycin and retinoic acid on expansion, stability and suppressive qualities of human CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) T regulatory cell subpopulations, *Haematologica* 98 (2013) 1291–1299, <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.074088>.
- [22] M. Rossetti, R. Spreafico, S. Saidin, C. Chua, M. Moshref, J.Y. Leong, Y.K. Tan, J. Thumboo, J. van Loosdregt, S. Albani, Ex vivo-expanded but not in vitro-induced human regulatory T cells are candidates for cell therapy in autoimmune diseases thanks to stable demethylation of the FOXP3 regulatory T cell-specific demethylated region, *J. Immunol.* 194 (2015) 113–124, <https://doi.org/10.10049/jimmunol.1401145>.
- [23] H.J. Kim, R.A. Barnitz, T. Kreslavsky, F.D. Brown, H. Moffett, M.E. Lemieux, Y. Kaygusuz, T. Meisner, T.A. Holderried, S. Chan, P. Kastner, W.N. Haining, H. Cantor, Stable inhibitory activity of regulatory T cells requires the transcription factor Helios, *Science (New York, N.Y.)* 350 (2015) 334–339, <https://doi.org/10.1126/science.1260616>.
- [24] L.S. Walker, D.M. Sansom, Confusing signals: recent progress in CTLA-4 biology, *Trends Immunol.* 36 (2015) 63–70, <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.12.001>.
- [25] R. Förster, A.C. Davalos-Misslitz, A. Rot, CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance, *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 362, <https://doi.org/10.1038/nri2297>.
- [26] K.N. MacDonald, J.M. Piret, M.K. Levings, Methods to manufacture regulatory T cells for cell therapy, *Clin. Exp. Immunol.* 197 (2019) 52–63, <https://doi.org/10.1111/cei.13297>.
- [27] S. Chandran, Q. Tang, M. Sarwal, Z.G. Laszik, A.L. Putnam, K. Lee, J. Leung, V. Nguyen, T. Sigdel, E.C. Tavares, J.Y.C. Yang, M. Hellerstein, M. Fitch, J.A. Bluestone, F. Vincenti, Polyclonal regulatory T cell therapy for control of inflammation in kidney transplants, *Am. J. Transplant.* 17 (2017) 2945–2954, <https://doi.org/10.1111/ajt.14415>.
- [28] G. Whitehouse, E. Gray, S. Mastoridis, E. Merritt, E. Kodela, J.H.M. Yang, R. Danger, M. Mairal, S. Christakoudi, J.J. Lozano, I.C. Macdougall, T.I.M. Tree, A. Sanchez-Fueyo, M. Martínez-Llordella, IL-2 therapy restores regulatory T-cell dysfunction induced by calcineurin inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (2017) 7083–7088, <https://doi.org/10.1073/pnas.1620835114>.
- [29] T. Cao, S.E. Wenzel, W.A. Faubion, G. Harriman, L. Li, Enhanced suppressive function of regulatory T cells from patients with immune-mediated diseases following successful ex vivo expansion, *Clin. Immunol.* 136 (2010) 329–337, <https://doi.org/10.1016/j.clim.2010.04.014>.
- [30] P. Hoffmann, T.J. Boeld, R. Eder, J. Huehn, S. Floess, G. Wieczorek, S. Olek, W. Dietmaier, R. Andreesen, M. Edinger, Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation, *Eur. J. Immunol.* 39 (2009) 1088–1097, <https://doi.org/10.1002/eji.200838904>.
- [31] L. Strauss, M. Czysowska, M. Szajnik, M. Mandapachil, T.L. Whiteside, Differential responses of human regulatory T cells (Treg) and effector T cells to rapamycin, *PLoS ONE* 4 (2009) e5994, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005994>.
- [32] M. Battaglia, A. Stablini, B. Migliavacca, J. Horejs-Hoek, T. Kaupper, M.-G. Roncarolo, Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients, *J. Immunol.* 177 (2006) 8338–8347.
- [33] S. Basu, T. Golovina, T. Mikheeva, C.H. June, J.L. Riley, Cutting edge: Foxp3-mediated induction of p12 allows human T regulatory cells to preferentially expand in rapamycin, *J. Immunol.* 180 (2008) 5794–5798, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.5794>.
- [34] S.L. Pumpura, M. Domínguez-Villar, The PI3K/AKT signaling pathway in regulatory T-cell development, stability, and function, *J. Leukoc. Biol.* (2018), <https://doi.org/10.1002/jlb.2mir0817-349r>.
- [35] W. Ouyang, O. Beckett, Q. Ma, J.-H. Paik, R.A. DePinho, M.O. Li, Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3+ regulatory T cells, *Nat. Immunol.* 11 (2010) 618–627, <https://doi.org/10.1038/ni.1884>.
- [36] Y.M. Kerdiles, E.L. Stone, D.R. Beisner, M.A. McGargill, I.L. Chen, C. Stockmann, C.D. Katayama, S.M. Hedrick, Foxo transcription factors control regulatory T cell development and function, *Immunity* 33 (2010) 890–904, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.12.002>.
- [37] Y. Wu, M. Borde, V. Heissmeyer, M. Feuerer, A.D. Lapan, J.C. Stroud, D.L. Bates, L. Guo, A. Han, S.F. Ziegler, D. Mathis, C. Benoist, L. Chen, A. Rao, FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT, *Cell* 126 (2006) 375–387, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.042>.
- [38] K. Wing, Y. Onishi, P. Prieto-Martín, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura, S. Sakaguchi, CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function, *Science (New York, N.Y.)* 322 (2008) 271–275, <https://doi.org/10.1126/science.1160062>.
- [39] H. Lin, J.C. Rathmell, G.S. Gray, C.B. Thompson, J.M. Leiden, M.L. Alegre, Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA4) blockade accelerates the acute rejection of cardiac allografts in CD28-deficient mice: CTLA4 can function independently of CD28, *J. Exp. Med.* 188 (1998) 199–204.
- [40] T. Zhang, S. Fresnoy, E. Welty, N. Sangrampurkar, E. Rybak, H. Zhou, X.F. Cheng, Q. Peng, C. Avon, A. Laaris, M. Whitters, A.M. Nagel, R.M. O'Hara Jr., A.M. Azimzadeh, Selective CD28 blockade attenuates acute and chronic rejection of murine cardiac allografts in a CTLA-4-dependent manner, *Am. J. Transplant.* 11 (2011) 1599–1609, <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03624.x>.
- [41] T.A. Judge, Z. Wu, X.G. Zheng, A.H. Sharpe, M.H. Sayegh, L.A. Turka, The role of CD80, CD86, and CTLA4 in alloimmune responses and the induction of long-term allograft survival, *J. Immunol.* 162 (1999) 1947–1951.
- [42] K.H. Toomer, T.R. Malek, Cytokine signaling in the development and homeostasis of regulatory T cells, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10 (2018), <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028597>.
- [43] Y.M. Kerdiles, D.R. Beisner, R. Tinoco, A.S. Dejean, D.H. Castrillon, R.A. DePinho, S.M. Hedrick, Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor, *Nat. Immunol.* 10 (2009) 176–184, <https://doi.org/10.1038/ni.1689>.
- [44] W. Ouyang, W. Liao, C.T. Luo, N. Yin, M. Huse, M.V. Kim, M. Peng, P. Chan, Q. Ma, Y. Mo, D. Meijer, K. Zhao, A.Y. Rudensky, G. Atwal, M.Q. Zhang, M.O. Li, Novel Foxo1-dependent transcriptional programs control Treg cell function, *Nature* 491 (2012) 554–559, <https://doi.org/10.1038/nature11581>.
- [45] J.C. Ochando, A.C. Yopp, Y. Yang, A. Garin, Y. Li, P. Boros, J. Llodra, Y. Ding, S.A. Lira, N.R. Krieger, J.S. Bromberg, Lymph node occupancy is required for the peripheral development of alloantigen-specific Foxp3+ regulatory T cells, *J. Immunol.* 174 (2005) 6993–7005.
- [46] N. Zhang, B. Schroppe, G. Lal, C. Jakubczik, X. Mao, D. Chen, N. Yin, R. Jessberger, J.C. Ochando, Y. Ding, J.S. Bromberg, Regulatory T cells sequentially migrate from inflamed tissues to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response, *Immunity* 30 (2009) 458–469, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.12.022>.
- [47] S.K. Chauhan, D.R. Saban, T.H. Dohman, R. Dana, CCL-21 conditioned regulatory T cells induce allotolerance through enhanced homing to lymphoid tissue, *J. Immunol.* 192 (2014) 817–823, <https://doi.org/10.10049/jimmunol.1203469>.
- [48] K.S. Smigiel, E. Richards, S. Srivastava, K.R. Thomas, J.C. Dudda, K.D. Klonowski, D.J. Campbell, CCR7 provides localized access to IL-2 and defines homeostatically distinct regulatory T cell subsets, *J. Exp. Med.* 211 (2013) 121–136, <https://doi.org/10.1084/jem.201311429> The Journal of Experimental Medicine.
- [49] E.M. Shevach, A.M. Thornton, tTregs, iTregs, and iTregs: similarities and differences, *Immunol. Rev.* 259 (2014) 88–102, <https://doi.org/10.1111/Imm.12160>.
- [50] M. Sebastian, M. Lopez-Ocasio, A. Metidji, S.A. Rieder, E.M. Shevach, A.M. Thornton, Helios controls a limited subset of regulatory T cell functions, *J. Immunol.* 196 (2016) 144–155, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501704>.
- [51] H. Takatori, H. Kawashima, A. Matsuki, K. Meguro, S. Tanaka, T. Iwamoto, Y. Sanayama, N. Nishikawa, T. Tamachi, K. Ikeda, A. Suto, K. Suzuki, S. Kagami, K. Hirose, M. Kubo, S. Hori, H. Nakajima, Helios enhances Treg cell function in cooperation with FoxP3, *Arthritis Rheumatol.* 67 (2015) 1491–1502, <https://doi.org/10.1002/art.39091>.
- [52] A.M. Thornton, J. Lu, P.E. Korty, Y.C. Kim, C. Martens, P.D. Sun, E.M. Shevach, Helios(+) and Helios(-) Treg subpopulations are phenotypically and functionally distinct and express dissimilar TCR repertoires, *Eur. J. Immunol.* 49 (2019) 398–412, <https://doi.org/10.1002/eji.201847935>.
- [53] Y.B. Chen, Y.A. Efebera, L. Johnston, E.D. Ball, D. Avigan, L.J. Lekakis, C.R. Bachier, P. Martin, O. Duramad, Y. Ishii, S. Han, Y.J. Jung, D. Lee, L. Kunke, R.S. Negrin, J.D. Bui, Increased Foxp3(+)Helios(+) regulatory T cells and decreased acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in patients receiving sirolimus and RGI-2001, an activator of invariant natural killer T cells, *Biol. Blood Marrow Transplant.* 23 (2017) 625–634, <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2017.01.069>.
- [54] B. Revilla-Nuin, A. de Bejar, L. Martínez-Alarcon, J.I. Herrero, C.M. Martínez-Caceres, P. Ramirez, A. Baroja-Mazo, J.A. Pons, Differential profile of activated regulatory T cell subsets and microRNAs in tolerant liver transplant recipients, *Liver Transpl.* 23 (2017) 933–945, <https://doi.org/10.1002/lt.24691>.
- [55] W. Du, Y.W. Shen, W.H. Lee, D. Wang, S. Paz, F. Kandeel, C.P. Liu, Foxp3+ Treg expanded from patients with established diabetes reduce Helios expression while retaining normal function compared to healthy individuals, *PLoS ONE* 8 (2013) e56209, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056209>.
- [56] X. Tai, M. Cowan, L. Feigenbaum, A. Singer, CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2, *Nat. Immunol.* 6 (2005) 152–162, <https://doi.org/10.1002/jlb.2mir0817-349r>.

- 1038/nil1160.
- [57] R. Zhang, A. Huynh, G. Whitcher, J. Chang, J.S. Maltzman, L.A. Turka, An obligate cell-intrinsic function for CD28 in Tregs, *J. Clin. Invest.* 123 (2013) 580–593, <https://doi.org/10.1172/jci65013>.
- [58] N. Rakebrandt, K. Littringer, N. Joller, Regulatory T cells: balancing protection versus pathology, *Swiss Med. Wkly.* 146 (2016) w14343, <https://doi.org/10.4414/smw.2016.14343>.
- [59] Y. Gao, J. Tang, W. Chen, Q. Li, J. Nie, F. Lin, Q. Wu, Z. Chen, Z. Gao, H. Fan, A. Tsun, J. Shen, G. Chen, Z. Liu, Z. Lou, N.J. Olsen, S.G. Zheng, B. Li, Inflammation negatively regulates FOXP3 and regulatory T-cell function via DBC1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112 (2015) E3246–E3254, <https://doi.org/10.1073/pnas.1421463112>.
- [60] X. Valencia, G. Stephens, R. Goldbach-Mansky, M. Wilson, E.M. Shevach, P.E. Lipsky, TNF downmodulates the function of human CD4+ CD25hi T-regulatory cells, *Blood* 108 (2006) 253–261, <https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-4567>.
- [61] X. Li, Y. Liang, M. LeBlanc, C. Benner, Y. Zheng, Function of a Foxp3 cis-element in protecting regulatory T cell identity, *Cell* 158 (2014) 734–748, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.030>.
- [62] S. Floess, J. Freyer, C. Siewert, U. Baron, S. Olek, J. Polansky, K. Schlawe, H.D. Chang, T. Bopp, E. Schmitt, S. Klein-Hessling, E. Serfling, A. Hamann, J. Huehn, Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells, *PLoS Biol.* 5 (2007) e38, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050038>.
- [63] S. Ville, N. Poirier, J. Branchereau, V. Charpy, S. Pengam, V. Nerrière-Daguin, S. Le Bas-Bernardet, F. Goulon, C. Mary, A. Chenouard, J. Hervouet, D. Minault, S. Nedellec, K. Renaudin, B. Vanhove, G. Blancho, Anti-CD28 antibody and belatacept exert differential effects on mechanisms of renal allograft rejection, *J. Am. Soc. Nephrol.* 27 (2016) 3577–3588, <https://doi.org/10.1681/ASN.2015070774> %
- J Journal of the American Society of Nephrology.
- [64] N. Ohkura, M. Hamaguchi, H. Morikawa, K. Sugimura, A. Tanaka, Y. Ito, M. Osaki, Y. Tanaka, R. Yamashita, N. Nakano, J. Huehn, H.J. Fehling, T. Sparwasser, K. Nakai, S. Sakaguchi, T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development, *Immunity* 37 (2012) 785–799, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.09.010>.
- [65] Y. Shu, Q. Hu, H. Long, C. Chang, Q. Lu, R. Xiao, Epigenetic variability of CD4+ CD25+ tregs contributes to the pathogenesis of autoimmune diseases, *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 52 (2017) 260–272, <https://doi.org/10.1007/s12016-016-8590-3>.
- [66] H. Morikawa, N. Ohkura, A. Vandenbon, M. Itoh, S. Nagao-Sato, H. Kawaji, T. Lassmann, P. Carninci, Y. Hayashizaki, A.R. Forrest, D.M. Standley, H. Date, S. Sakaguchi, Differential roles of epigenetic changes and Foxp3 expression in regulatory T cell-specific transcriptional regulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111 (2014) 5289–5294, <https://doi.org/10.1073/pnas.1312717110>.
- [67] A.P. Cribbs, A. Kennedy, H. Penn, P. Amjadi, P. Green, J.E. Read, F. Brennan, B. Gregory, R.O. Williams, Methotrexate restores regulatory T cell function through demethylation of the FoxP3 upstream enhancer in patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheumatol.* 67 (2015) 1182–1192, <https://doi.org/10.1002/art.39031>.
- [68] H. Kasahara, T. Kondo, H. Nakatsukasa, S. Chikuma, M. Ito, M. Ando, Y. Kurebayashi, T. Sekiya, T. Yamada, S. Okamoto, A. Yoshimura, Generation of allo-antigen-specific induced Treg stabilized by vitamin C treatment and its application for prevention of acute graft versus host disease model, *Int. Immunol.* 29 (2017) 457–469, <https://doi.org/10.1093/intimm/dxx060>.