



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA

GENERACIÓN Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS T REGULADORAS ALOESPECÍFICAS EN
PACIENTES RECEPTORES DE TRASPLANTE RENAL

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
EVELYN KATY ALVAREZ SALAZAR

TUTOR PRINCIPAL:
DRA. MARÍA GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. JANETTE FURUZAWA
FACULTAD DE MEDICINA
DR. HÉCTOR MAYANI
FACULTAD DE MEDICINA

Ciudad Universitaria, CD. MX. Octubre 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

"Pedid, y se os dará; buscad, y hallaréis; llamad, y se os abrirá. Porque todo el que pide, recibe; y el que busca, halla; y al que llama, se le abrirá"

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y mis hermanas por su amor,

La Dra. Gloria por aceptarme y dirigirme,

Mis compañeros del laboratorio por los momentos vividos,

La nueva familia que Dios me envió, gracias Ivan por tu paciencia y compañía,

A Dios, por rodearme de gente maravillosa

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
1. Sistema Inmune.....	7
2. Trasplante de órganos.....	13
3. Drogas inmunosupresoras.....	21
4. Células T reguladoras.....	26
5. Células T reguladoras y la tolerancia al Aloinjerto.....	35
6. Impacto de las drogas inmunosupresoras sobre las células T reguladoras.....	37
7. Estrategias desarrolladas para la utilización eficaz de células T reguladoras en la inmunoterapia.....	39
8. ¿Células Tregs tímicas expandidas o Tregs generadas de novo para la inmunoterapia en trasplante?.....	47
9. Ensayos clínicos.....	55
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	59
HIPÓTESIS.....	60
JUSTIFICACIÓN.....	61
OBJETIVOS.....	62
MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
RESULTADOS.....	79
DISCUSIÓN.....	117
CONCLUSIONES.....	141
PERSPECTIVAS.....	142
REFERENCIAS.....	143

RESUMEN

Belatacept (CTLA-4-Ig) es una proteína recombinante con efectos beneficiosos sobre la función y supervivencia del injerto en comparación con Ciclosporina A. Sin embargo, al ser un inhibidor de la coestimulación podría tener un efecto negativo sobre la generación u homeostasis de las Tregs en pacientes trasplantados. En este trabajo se caracterizó la frecuencia, función y estado epigenético del TSDR FOXP3 de Tregs circulantes de receptores renales después de 7 años de tratamiento con Belatacept o Ciclosporina A. Los estudios del fenotipo mostraron una reducción significativa en la proporción de las células T $CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo/-}FOXP3^+$ en ambos tratamientos comparados al grupo control (individuos sanos). Los análisis funcionales señalaron que las Tregs de los pacientes bajo Belatacept o Ciclosporina A presentan una reducción en su capacidad de supresión comparada a los controles, que correlaciona con una menor expresión de CD25 y FOXP3 de sus Tregs. Finalmente, el análisis de metilación de la región de desmetilación Treg-específica (TSDR) del gen FOXP3 señala un incremento en la metilación de la región TSDR en los pacientes trasplantados, que correlaciona con su disminuida capacidad de supresión. Nuestros datos indican que Belatacept puede tener un efecto deletéreo sobre la frecuencia y función de las Tregs en pacientes trasplantados.

Una alternativa al uso de los inmunosupresores, es el empleo de Tregs como terapia adoptiva, debido a su papel crucial en el mantenimiento de la tolerancia al órgano trasplantado. En la segunda parte del trabajo se desarrolló una metodología para generar y expandir Tregs *in vitro* específicas al antígeno del donante, con fenotipo y función supresora estable en presencia de citocinas proinflamatorias. Se derivaron células dendritas a partir de monocitos sanguíneos que fueron cocultivados con células T

“naïve” entre diferentes individuos. Después de 7 días de cocultivo, se separaron las células CD25^{hi} proliferantes (iTregs aloespecíficas), se procedió a expandirlas durante 6 semanas y se evaluó su fenotipo, supresión y medición de citocinas en los sobrenadantes. A las 6 semanas de expansión, el 88.5% de las células fueron CD25⁺FOXP3⁺ y alcanzaron una expansión de 2,300 veces el número inicial. Estas células fueron estables en presencia de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-6, dado que no se observó cambios de fenotipo y expresión de FOXP3, además que presentaron una supresión aloespecífica que no fue afectada por la adición de las citocinas mencionadas. Sin embargo, las células iTregs alo expandidas, requieren de rapamicina para mantener su fenotipo y expresión de FOXP3, por lo que se debe considerar este agente dentro de la terapia de mantenimiento en un posible uso clínico. En conclusión se lograron inducir un buen número de iTregs con supresión aloespecífica y estables en presencia de citocinas proinflamatorias.

ABSTRACT

Belatacept, is an effective alternative to calcineurin inhibitors that appears to preserve graft survival and function, however, the impact of this drug in the homeostasis of Tregs in transplanted patients remains controversial. Here we analyzed the phenotype, function and the epigenetic status of the FOXP3 TSDR of circulating Tregs from long-term kidney transplant patients under Belatacept or Cyclosporine A treatment. We found a significant reduction in the proportion of CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo/-}FOXP3⁺ T cells in all patients compared to controls. Functional analysis demonstrated that Tregs from transplanted patients displayed a significant reduction in their suppressive capacity compared to Tregs from controls, which is associated with decreased levels of FOXP3 and CD25. Interestingly, Tregs from Belatacept-treated patients were still capable of suppressing IFN- γ production by activated T cells. Analysis of the methylation status of the Treg-specific demethylation region (TSDR) of the FOXP3 gene showed that Belatacept treatment results in methylation of CpG islands within the TSDR, which could be associated with the impaired Treg suppression function. Our data indicate that the reported beneficial effects of Belatacept treatment are not a direct consequence of the frequency and function of circulating Tregs.

Regulatory T cells are considered key players in the prevention of allograft rejection in transplanted patients, which motivated the development of strategies to expand Tregs cells to be used in clinical therapy. In the second part of the work a methodology was developed to generate and expand allo-specific Tregs with stable suppressive function in the presence of pro-inflammatory cytokines. Dendritic cells were derived from monocytes isolated from healthy voluntaries and were co-cultured with naive T cells from an unrelated individual. After 7 days of co-culture, proliferating CD25^{HI} cells (allo-specific induced-Tregs) were sorted and expanded for 6 weeks. The phenotype,

suppressor function and production of cytokines were evaluated. After 6 weeks of expansion, iTreg cells were expanded 2300 times, giving rise to 4,600 millions of allospecific induced Tregs from 20,000 initial naïve T cells. At that time, the 88.5% of the expanded cells were CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, and their phenotype (FOXP3⁺, CD25^{hi}) were preserved in presence of pro-inflammatory cytokines TNF α and IL-6. Interestingly, allospecific iTregs were able to specifically suppress the proliferation of autologous CD4⁺ and CD8⁺ T cells in response to the allo-MoDCs used for iTreg generation, but not to third party allo-MoDCs. When TGF β and/or Rapamycin were removed from expansion cultures, iTreg cells showed an altered phenotype and decreased FOXP3 expression, suggesting that the use of *in vitro* generated allospecific iTregs cells in adoptive therapy will require the use of Rapamycin to ensure their stability and efficacy. In conclusion, a good number of allospecific iTregs were induced and stable phenotype and suppressor function in the presence of pro-inflammatory cytokines.

INTRODUCCIÓN

El trasplante de órganos es la solución terapéutica de uso más frecuente y eficaz para aumentar la supervivencia y mejorar la calidad de vida en pacientes con enfermedad aguda o crónica de algún órgano. Sin embargo, las diferencias genéticas entre el donante y receptor son las responsables de que el receptor ponga en marcha una respuesta inmune de rechazo dirigida contra las estructuras extrañas presentes en las células del injerto trasplantado [1]. El desarrollo y uso clínico de fármacos inmunosupresores permitió una mejoría sin precedente en la supervivencia del injerto a corto plazo, pero el uso prolongado de estos fármacos acarrea un gran número de efectos adversos responsables de la pérdida del injerto a largo plazo [2].

El principal objetivo en el trasplante es alcanzar la ausencia de respuesta inmune frente a los antígenos del donante sin necesidad de administraciones prolongadas de fármacos inmunosupresores. Se ha establecido que los mecanismos inmunológicos que intervienen en la inducción de tolerancia hacia un aloinjerto son básicamente los mismos que mantienen la tolerancia hacia los antígenos propios. Sin embargo, una diferencia importante radica en la alta frecuencia de células T alorreactivas en el repertorio general y en la ausencia de selección tímica de las células T alorreactivas en humanos. Por esto, la interacción de los mecanismos de tolerancia periférica parece ser el factor más importante en la aceptación del injerto a largo plazo, y entre ellos la regulación inmunológica parece ser uno de los mecanismos predominantes, siendo las células T reguladoras (Tregs) las principales mediadoras de este mecanismo [3, 4].

Existen numerosas evidencias que señalan el papel crítico de las células T reguladoras en la tolerancia hacia aloinjertos, por lo que se ha propuesto que la aceptación de trasplantes en humanos estaría asociada con la regulación inmunológica

por parte de estas células, que podrían influir en el curso del trasplante y su aceptación a largo plazo [5]. Por este motivo, es primordial conocer el impacto de los fármacos inmunosupresores sobre el mantenimiento y función de las células T reguladoras en el individuo trasplantado, debido a la coexistencia continua de estas células con los fármacos, esenciales para evitar las crisis de rechazo agudo y crónico.

Las células T reguladoras no solo contribuyen al mantenimiento de la tolerancia a antígenos propios y regulación de la respuesta inmune contra antígenos extraños, sino que también funcionan limitando la respuesta alorreactiva, por lo que es plausible el desarrollo de un amplio número de estrategias que permiten su expansión y generación *in vitro*, con la intención de re-infundirlas y utilizarlas para la inmunoterapia. Si bien la generación *in vitro* de Tregs tienen como desventaja su inestabilidad, su participación primordial en la tolerancia a antígenos extraños y función más eficiente en condiciones inflamatorias podrían indicar una ventaja en la regulación de la respuesta alorreactiva. Por ello, es importante continuar desarrollando y mejorando estrategias que permitan generar Tregs *in vitro* a gran escala, con fenotipo y función estable, además de garantizar su estabilidad en condiciones inflamatorias, con el fin de ser utilizadas como terapia adoptiva en la inducción de tolerancia específica al órgano trasplantado.

1. SISTEMA INMUNE

El sistema inmune es el conjunto de estructuras y procesos biológicos capaces de proporcionar defensa o inmunidad al organismo frente a agresiones externas e internas, con el fin de mantener la homeostasis o equilibrio interno.

El sistema inmunológico está formado por una red compleja y vital de órganos, tejidos y células responsables de la inmunidad. Las defensas contra los microbios, así como a macromoléculas reconocidas como extrañas, está mediada por las reacciones tempranas de la inmunidad innata y las respuestas tardías de la inmunidad adaptativa [6].

1.1 Inmunidad innata y adaptativa

La inmunidad innata consta de mecanismos de defensas celulares y bioquímicas que existen incluso antes de la infección. Los sistemas de respuesta inmunitaria innata varían desde las barreras externas (piel, mucosas, cilios, secreciones, etc.) hasta los receptores sofisticados codificadas por genes de la línea germinal, capaces de reconocer los “Patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMP), que son comunes a muchas clases de microbios y toxinas normalmente no presentes en el huésped. Sin embargo muchos microorganismos son resistentes a la inmunidad innata y su eliminación exige mecanismos más potentes propios de la inmunidad adaptativa que actúan a su vez potenciando los mecanismos protectores de la inmunidad innata [7].

La inmunidad adaptativa adopta un abordaje discriminatorio, con un repertorio muy grande de receptores específicos de antígenos codificados por genes que se re-arreglan somáticamente para dar lugar a moléculas de unión antigénica con una exquisita especificidad que pueden reconocer prácticamente todos los componentes de un agente

extraño. La especificidad de la respuesta permite que se genere la memoria inmunológica, respondiendo de forma más vigorosa a exposiciones repetidas del mismo microorganismo. Los componentes principales de la inmunidad adaptativa son los linfocitos y sus productos de secreción. Los linfocitos T y B son las células encargadas de la defensa específica, dado que expresan una diversidad de receptores de membrana que viene dada por la existencia de múltiples segmentos antigénicos V(D)J que se reagrupan durante el desarrollo linfocitario. Ambas subpoblaciones se originan en la médula ósea a partir de un progenitor linfoide común; estos precursores pueden completar su maduración en la médula ósea dando origen a los linfocitos B, células involucradas en la respuesta inmunitaria humoral; o pueden migrar a través de los vasos sanguíneos hacia el timo, donde completan su maduración como linfocitos T [8].

1.2 Linfocitos T

Los linfocitos T cumplen un papel esencial en la inmunidad celular. Estas células maduran en el timo, y al igual que los linfocitos B, pasan por distintos estadios caracterizados por una expresión diferencial de marcadores típicos. Una vez maduros, estas células recirculan a través de los órganos linfoides secundarios donde pueden ser activadas al reconocer los antígenos específicos presentados por las células presentadoras de antígenos (APCs) como los macrófagos, linfocitos B y células dendríticas.

1.2.1 Desarrollo tímico

Durante la maduración de los linfocitos T, los segmentos génicos del TCR (T cell receptor) se reordenan de forma ordenada dando lugar a la formación de los genes

funcionales α y β ó γ y δ del TCR. La mayoría de las células T re-arreglan su cadena α y β del receptor y son denominadas linfocitos T α/β .

En su fase más temprana, los timocitos carecen de los correceptores CD4 y CD8, por lo que se denominan dobles negativos (DN). En esta etapa, los precursores de los linfocitos T α/β experimentan el proceso de selección β , que requiere que los timocitos señalicen a través del pre-TCR que consiste de un producto del gen TCR β adecuadamente re-arreglado, las cadenas CD3 y la subunidad pT α invariante. Los timocitos que pasan la selección β , entran a una fase proliferativa, expresan CD4 y CD8 definiéndose como dobles positivas (DP) y re-arreglan el gen TCR α , resultando en la expresión superficial del TCR α/β maduro. Aquellas células que no experimentan selección β son eliminadas por apoptosis.

Posteriormente, los linfocitos DP experimentan un fenómeno de selección positiva y negativa con el fin de que sus TCR solo sean capaces de reconocer antígenos extraños en conjunto con las moléculas del MHC (Major Histocompatibility Complex) propio, presentadas por las APCs del timo. Mientras que la selección positiva es mediada exclusivamente por las células epiteliales de la corteza, la selección negativa puede ser mediada por varios tipos de células como las células dendríticas y los macrófagos presentes en la médula tímica.

La selección positiva no sólo selecciona un repertorio de células que pueden interactuar con las moléculas del MHC propio de un individuo, sino que también determina si un linfocito T DP se transformara en un linfocito T CD4 o en un linfocito T CD8. En la selección negativa se eliminan los linfocitos T cuyos receptores de antígeno se unen con demasiada fuerza a los complejos de autopéptidos y moléculas del MHC propio. Sin embargo, existen un grupo de linfocitos que reconocen con mucha fuerza a

los complejos mencionados, en un nivel más grande de lo requerido para la selección positiva, pero sin consecuencias apoptóticas. Estas células reciben el nombre de células T reguladoras y cumplen un papel fundamental en el mantenimiento de la tolerancia periférica.

Se calcula que al menos el 97% de los timocitos en desarrollo sufren apoptosis dentro del timo (Tolerancia central), por lo que los fenómenos de selección tímica asegura la eliminación de los timocitos reactivos a antígenos propios y la generación de linfocitos T con un TCR capaz de reconocer antígenos extraños. Tras los fenómenos de selección, los linfocitos T CD4 o CD8 simples positivos (SP) abandonan el timo como célula T madura virgen, salen a circulación y llegan a los órganos linfoides secundarios, donde pueden ser activadas al reconocer antígenos específicos [9].

1.2.2 Reconocimiento antigénico

El reconocimiento antigénico desencadena una cascada de señalización intracelular que conlleva a un aumento en la expresión de integrinas, modificaciones del citoesqueleto y producción de factores de transcripción involucrados en la liberación de citocinas y mediadores inflamatorios. En la mayoría de los casos, la unión del antígeno con el complejo de membrana TCR/CD3 (formado por las cadenas α y β del receptor de las células T y el conjunto de cadenas CD3) no es suficiente para dar lugar a una respuesta eficaz, ya que se requiere de moléculas accesorias que facilitan la interacción entre las células T con las APCs, además de participar en la transducción de señales y activación de células T. Entre estas moléculas se tienen a los correceptores CD8 y CD4 que interactúan con regiones no polimórficas del MHC clase I y II respectivamente; el CD2 que interactúa con LFA-3 (Lymphocyte function-associated antigen 3); el CD28 y

CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) que interactúan con CD80/86 y el CD45 cuyo ligando extracelular aún no está definido [10].

Una vez que el TCR reconoce al complejo péptido-MHC, ocurren unos cambios conformacionales en las cadenas del complejo CD3, que lleva a su fosforilación vía sus dominios ITAM (Immunoreceptor Tyrosine Based Activation Motifs) mediante las tirosina quinasas LCK y Fyn que se encuentran asociadas a las colas citoplasmáticas del CD4 y CD8. Estas tirosina quinasas son activadas previamente mediante la actividad fosfatasa del CD45. Los ITAM fosforilados del CD3 reclutan y activan la quinasa ZAP70 vía interacciones con su dominio SH2. El ZAP70 entonces fosforila a la proteína asociado a membrana LAT que funciona como andamiaje. LAT a su vez recluta SIp-76 para su fosforilación por ZAP70. El complejo LAT-SIp-76 recluta varias moléculas efectoras de señalización como la fosfolipasa C (PLC- γ 1) que transduce las señales del TCR mediante degradación de fosfatidil inositol bifosfato (PIP2) para generar segundos mensajeros como diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). El DAG activa muchas proteínas como la PKC (protein kinase C) y RAsGRP (RAS guanyl nucleotide-releasing protein). El PKC participa en activar la vía NF- κ B mientras que RAsGRP es un activador crucial de la vía MAPK. Por otra parte, IP3 estimula la salida de calcio del retículo endoplasmático hacia el citoplasma. Los niveles elevados de calcio inducen la activación de la proteína fosfatasa calcineurina, el cual a su vez defosforila al NFAT que migra al núcleo y se une a otros factores de transcripción para la activación de varios genes específicos. Este proceso de activación es más eficiente, si los linfocitos T reciben estímulos de ciertas citocinas como IL-2, mediante unión a sus receptores específicos de membrana [11].

1.2.3 Reconocimiento alogénico

El proceso de selección tímica asegura la eliminación de los timocitos cuyos TCRs no responden o son muy reactivos a antígenos propios, y la selección de aquellos linfocitos cuyos TCRs tienen un repertorio capaz de reconocer el complejo péptido extraño-MHC propio. Aproximadamente el 0.01% de las células T tienen un repertorio capaz de responder a un péptido extraño presentado por MHC-propio. Sin embargo, 1 - 10% de las células T son capaces de reconocer el complejo péptido-MHC extraño, que recibe el nombre de reconocimiento alogénico para diferenciarlo de lo convencional [7].

Existen dos hipótesis que tratan de explicar la alta frecuencia de células T alorreactivas: 1) Hipótesis del complejo binario múltiple, que sugiere un mimetismo molecular existente entre las moléculas MHC-alo y las MHC-propias, por lo que es el alopéptido quien va a desencadenar la alorrespuesta; 2) hipótesis de la alta densidad determinante, donde el TCR detecta las diferencias estructurales presentes en las regiones polimórficas del MHC-alo quien va a desencadenar la activación de las células T alorreactivas [7]. La menor contribución del péptido en el reconocimiento de las células T alogénicas al complejo péptido-MHC puede sugerir que la respuesta alogénica es menos específica que una respuesta convencional (respuesta degenerada), sin embargo se ha publicado que las células T alorreactivas tienen un TCR capaz de interactuar con múltiples complejos péptido-MHC en ligeramente diferentes orientaciones dependiendo del péptido unido, pero siempre con un alto grado de especificidad para ambos MHC y péptido como ocurre en una respuesta T convencional [12]. Las diferentes combinaciones de péptido-MHC reconocidas por el TCR no necesariamente poseen una homología estructural, por lo que la flexibilidad dentro de la estructura del TCR permitiría su adaptación a los diferentes contactos de superficie péptido-MHC [13]. Por otra parte, se ha reportado que las células T de individuos sensibilizados con los péptidos del virus Epstein-Barr presentados por su MHC-HLAB8

son capaces de reconocer el MHC alogénico-HLAB44, por lo que las células T de memoria generadas después de una infección pueden tener una respuesta alorreactiva a través del reconocimiento cruzado del complejo péptido-MHC alogénico como péptido microbiano-MHC propio, un fenómeno conocido como inmunidad heteróloga [14].

La alorreactividad de las células T contra las moléculas del MHC es una de las principales barreras para el éxito del trasplante de órganos, tejidos y células, por lo que su delección o inhibición de las células T alorreactivas puede resultar en la aceptación del aloinjerto o inducción de tolerancia.

2. TRASPLANTE DE ÓRGANOS

Trasplante se define como la transferencia de órganos, tejidos o células vivas de un individuo a otro. Es la sustitución de un órgano o tejido que ya no funciona por uno sano, con el objetivo de restituir las funciones perdidas. En la actualidad, los trasplantes son cada vez más seguros y de mejores resultados, permitiendo que los pacientes, condenados a muerte en la mayoría de los casos, tengan la posibilidad de una vida más larga y de mejor calidad [15, 16].

Los trasplantes de órganos son intervenciones quirúrgicas mayores y dada la especialización de sus estructuras celulares y su elevada demanda metabólica toleran escasos tiempos de isquemia (estrés celular causado por una disminución del flujo sanguíneo) [17].

El *trasplante renal* es uno de los grandes avances de la medicina moderna y ha sido calificado como “el milagro del siglo XX”. Su comienzo clínico se produce en la década de los 50 precedido de experiencias en animales y humanos que ya anunciaban

la posibilidad de utilizar esta terapia en enfermos con insuficiencia renal terminal que precisaban la diálisis para mantenerse con vida. [18].

El trasplante renal es indiscutiblemente la terapia de elección para los pacientes con Insuficiencia Renal Crónica (IRC), que es una pérdida progresiva e irreversible de las funciones renales [19]. Existen diversas condiciones asociadas al deterioro irreversible de la función y estructura nefrológica hasta llegar a la IRC, entre las que se encuentran factores de riesgo como: Hipertensión Arterial Sistémica y Diabetes Mellitus, asociado a condiciones infecciosas como en la glomerulonefritis, uso de fármacos nefrotóxicos, así como antecedente de Lesión Renal Aguda, entre otras [20].

Los pacientes con enfermedad renal en fase terminal pueden recibir terapias de reemplazo renal como diálisis y hemodiálisis, pero el trasplante es generalmente aceptado como el mejor tratamiento en términos de calidad de vida y costo-efectividad en comparación con la diálisis. Según estadísticas del Centro Nacional de Trasplantes (CENATRA), actualmente existen 14,889 pacientes en espera de un trasplante renal, lo cual representa más de la mitad (66%) de todos los receptores en lista en espera de cualquier órgano sólido (Sistema informático del CENATRA, corte al 14 de agosto de 2018).

2.1 Rechazo del aloinjerto

El mayor inconveniente para el progreso y desarrollo de los trasplantes radica en el fenómeno del rechazo del órgano trasplantado [21] y según la velocidad con la que se produce y los mecanismos inmunológicos involucrados pueden distinguirse tres tipos de rechazo:

- El rechazo hiperagudo, que se produce dentro de las 48 hr tras el trasplante, está mediado por anticuerpos preformados en el receptor, dirigidos a los antígenos del donante. Actualmente, este rechazo es un evento muy raro debido a la aplicación de la prueba cruzada pre-trasplante realizada al paciente, por lo que su incidencia ha disminuido hasta ser del 0.1-1%.
- El rechazo agudo, que se realiza dentro los primeros meses después del trasplante y está mediado por los linfocitos T alorreactivos que reconocen los antígenos del injerto. Sin embargo, la terapia inmunosupresora puede resolver este problema, aunque sigue siendo una causa frecuente de pérdida del injerto en el primer año post-trasplante con una incidencia global del 5 al 10%, aunque pueden tener una incidencia mayor del 30% en pacientes con alto riesgo inmunológico [22].
- Rechazo crónico, que aparece en periodos más tardíos y consiste en el deterioro lento y progresivo de la función del aloinjerto a pesar del tratamiento inmunosupresor, y es la forma más común de pérdida del injerto, y puede deberse a factores inmunológicos y no inmunológicos.

La tasa de éxito del paciente con un riñón trasplantado es al cabo de un año del 90 por ciento, a los cinco años de en torno al 65 por ciento y a los diez años, del 50 por ciento. La incidencia de rechazo agudo es mayor durante los primeros 6 meses, mientras que el rechazo crónico aumenta luego del año, en especial en el subgrupo de alto riesgo inmunológico (receptores hiperinmunizados, retrasplante, reactividad en prueba cruzada, incompatibilidad de HLA) [23].

Se ha señalado que al menos el 80% de los pacientes con disfunción renal del aloinjerto presentan signos de nefropatía crónica del aloinjerto (NCA), cuya principal característica incluye atrofia tubular, engrosamiento fibroso de las arterias, fibrosis del

intersticio renal y glomeruloesclerosis. Además, al menos el 50% de los pacientes trasplantados desarrollan signos de NCA dentro de los 10 años del trasplante [24].

Desde el punto de vista epidemiológico hay factores que se asocian a la disfunción renal como son la edad del donante, la función retardada del injerto, los antecedentes de rechazo agudo, la nefrotoxicidad por anticalcineurínicos, la hipertensión arterial y la diabetes [25].

2.2 Alorreconocimiento

Las diferencias genéticas entre el donante y receptor son las responsables de que el receptor ponga en marcha una respuesta inmune de rechazo dirigida contra las estructuras extrañas presentes en las células del injerto, por lo que el éxito o fracaso de un trasplante depende en gran medida de la relación genética existente entre el donante y receptor. El aloinjerto es la forma más común de trasplante y se refiere a injertos entre miembros de la misma especie pero que difieren genéticamente. El complejo mayor de histocompatibilidad [MHC o HLA (Human Leukocyte Antigen) en humanos] es el que determina en gran parte el grado de compatibilidad o incompatibilidad en el trasplante de órganos, debido a su gran polimorfismo y su alto nivel de expresión.

El reconocimiento por las células T del receptor de las moléculas de HLA del donante (alorreconocimiento) es el principal evento que lleva al rechazo del órgano. En los estados tempranos después del trasplante, las APCs del donante migran fuera del órgano trasplantado hacia los órganos linfoides secundarios del receptor, donde maduran e interactúan con células T “naïve” y de memoria del receptor (alorreconocimiento directo), y se da la activación de las células T específicas para el aloantígeno que van al injerto e inducen una respuesta inflamatoria, resultando en daño del injerto. De manera sorprendente se ha estimado que en individuos que nunca

estuvieron expuestos a células o tejidos alogénicos, cerca del 1-10% del repertorio de células T son capaces de reaccionar con moléculas HLA intactas, y de ellas aproximadamente el 50% corresponden a células T de memoria. El fenómeno de reacción cruzada podría explicar este alto porcentaje, donde los linfocitos T de memoria específicos de antígenos microbianos son capaces de reconocer aloantígenos y de esa manera contribuir a la alta frecuencia de células T alorreactivas [26]. A diferencia de las células T “naïve” cuya circulación está restringida a los órganos linfoides secundarios, las células T de memoria se pueden encontrar en los tejidos linfoides y no linfoides, además de ser capaces de ejercer sus funciones efectoras y causar daño al aloinjerto, sin necesidad de pasar antes por los órganos linfoides secundarios [22].

En etapas posteriores del trasplante, el número de APCs del donante se encuentran reducidas ya sea por eliminación directa por las células alorreactivas del receptor [23] o simplemente mueren por apoptosis, pero la respuesta inmune contra el injerto es mantenida por las APCs del receptor que procesan y presentan las moléculas MHC alogénicas que se desprenden del injerto (vía indirecta y semi-directa) [27]. Dado que las APCs del donante son eliminadas a los pocos días del trasplante, se ha postulado que la vía directa del alorreconocimiento predomina en el rechazo agudo de órganos, y que la vía indirecta sería responsable del rechazo crónico, representando esta vía la principal amenaza para la supervivencia del trasplante a largo plazo. Sin embargo se ha propuesto que moléculas intactas del complejo MHC-péptido del donante pueden ser transferidas (vía contacto celular y mediante secreción de vesículas extracelulares) a las APCs del receptor y de esa manera mantener la activación de las células T con aloespecificidad directa a lo largo del tiempo de vida del trasplante (ver Figura 1) [24, 28].

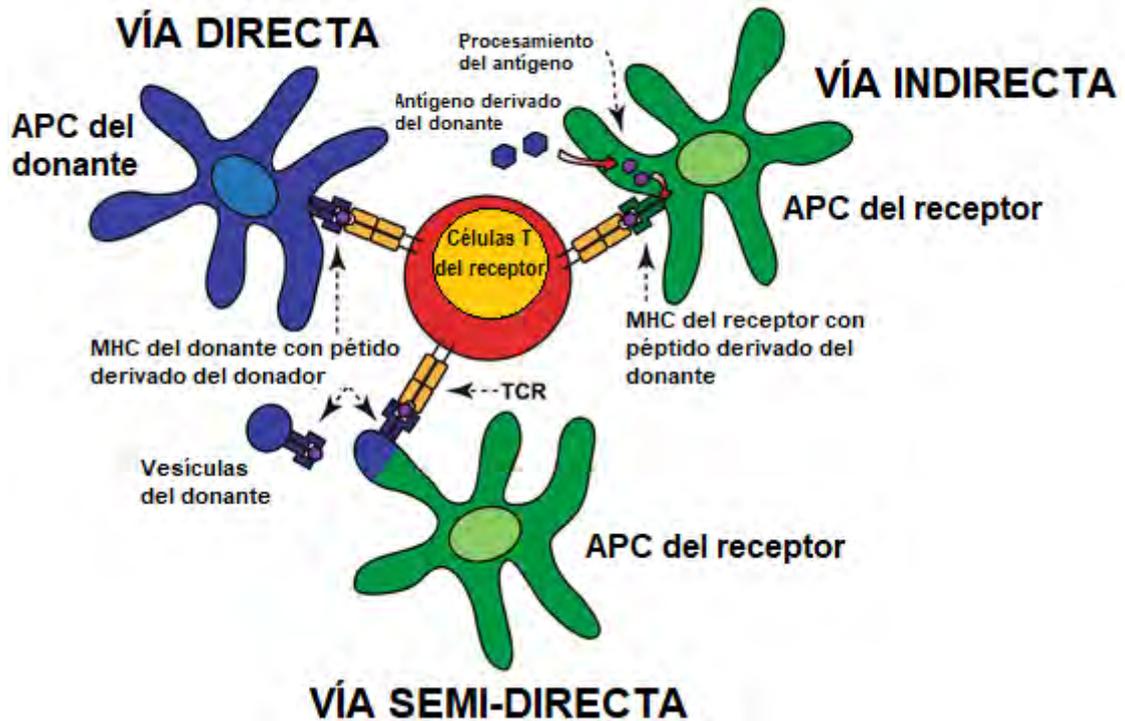


Figura 1. Vías de alorreconocimiento. Las células T del receptor pueden reconocer a los aloantígenos del donante mediante tres vías: interactuando con las moléculas del MHC presentes en las APCs del donante (directa), reconociendo los péptidos procesados del donador y presentados por sus propias APCs (indirecta) y una tercera donde las APCs del receptor adquieren las moléculas intactas del MHC del donante (semi-directa) [25].

2.3 Activación de las células T alorreactivas

La activación de las células T es un proceso estrechamente regulado que involucra numerosas interacciones de receptores y moléculas de señalización, resultando en la producción de citocinas así como en la expansión clonal y diferenciación de los linfocitos T efectores. En general, son tres las señales que permiten la activación plena de la célula T CD4 al reconocer antígenos específicos, para su subsecuente proliferación y diferenciación en células T efectoras alorreactivas. La señal 1 está otorgada por la interacción de antígenos de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de las células dendríticas del donante (APC) con el receptor de la célula T CD4 a través del complejo

CD3. La propia célula dendrítica provee la señal de coestimulación o señal 2, mediante la expresión de las moléculas CD80 y CD86 en la superficie de dichas células, las cuales se unen al receptor CD28 presente en la célula T. La respuesta bioquímica próximo al reconocimiento del antígeno es la fosforilación de la tirosinas de los motivos ITAM del complejo TCR/CD3, seguido de la activación de varias vías de señalización como la cascada Ras/ERK MAPK, la vía Calcio/Calcineurina/NFAT y la vía PKC/IKK/NFκB, los cuales activan los factores de transcripción AP-1, NFAT y NFκB, respectivamente [29]. CD28 proporciona señales que potencian muchas respuestas de los linfocitos T al antígeno, como la supervivencia celular, la producción de citocinas y la diferenciación de los linfocitos T vírgenes; en su ausencia, los linfocitos T que entran en contacto con antígenos no responden y mueren mediante apoptosis o entran en un estado de anergia [30].

La señal 1 y 2 activan vías de transducción que a su vez activaran factores de transcripción para la síntesis de varias moléculas de membrana como CD154, CD25, además de la producción de IL-2 y otras citocinas que se unen a sus receptores en la membrana de las células T, proporcionando las señales de crecimiento a través de la vía PI-3K (Phosphoinositide-3-kinase) y la vía mTOR (Molecular target of rapamycin), aportando así la señal 3, la cual promoverá la proliferación celular. El requerimiento de la tercera señal fue inicialmente demostrada en cultivos de células T CD8⁺ “naïve”, quienes en ausencia de IL-12 se encuentran afectadas sus funciones citolíticas y expansión clonal [31]. Mientras IL-12 es requerido en conjunto con el antígeno e IL-2 para estimular una significativa respuesta de las células T CD8⁺, IL-1 es capaz de aumentar la respuesta de las células T CD4⁺ hacia el antígeno e IL-2 [32].

La proliferación linfocitaria requiere la síntesis de novo de purinas y pirimidinas, así la proliferación y diferenciación dará lugar a un gran número de células T efectoras. Además, las células T activadas incrementan la actividad de otras células involucradas en la respuesta inmunológica, tales como las células B, las células T citotóxicas (células T CD8+) y los propios macrófagos, resultando en una reacción inmunológica cooperativa (ver Figura 2) [33].

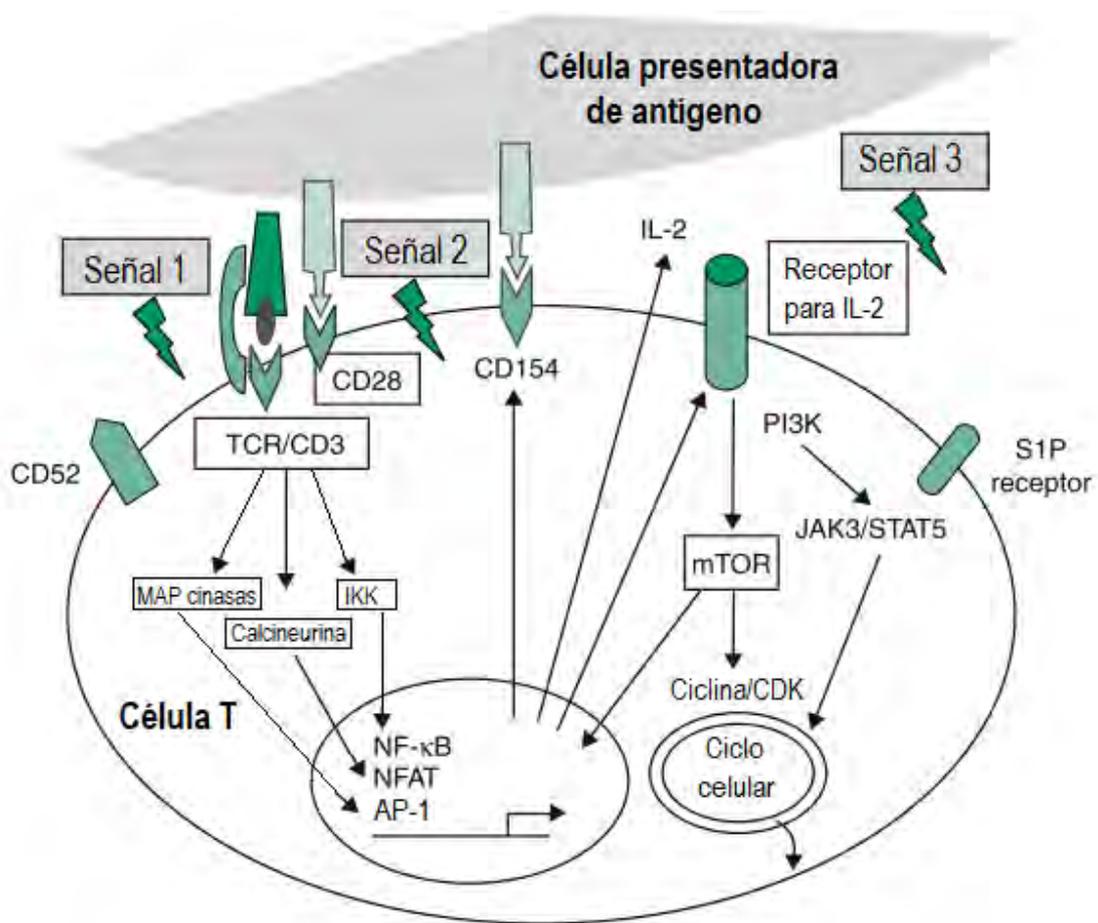


Figura 2. Activación de los linfocitos T. La activación plena de los linfocitos T requiere por lo menos tres señales: El reconocimiento antigénico, la interacción de las moléculas coestimuladoras y la señalización a través de sus receptores para citocinas [34].

Una condición necesaria para activar la maquinaria del rechazo es la respuesta inmune innata. Si bien las células T tienen un papel crítico en el rechazo agudo, existe una sobre-regulación de mediadores proinflamatorios en el aloinjerto antes de que

ocurra la respuesta de la célula T. Inicialmente, se activa la respuesta innata al daño tisular, como consecuencia del trauma quirúrgico del trasplante y de isquemia/reperfusión que liberan moléculas endógenas capaces de activar los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, “Pattern Recognition Receptors”) que reconocen las señales del daño, promoviendo la activación de las APCs del donante y su migración a las áreas de las células T. Otras células del sistema inmune innato como los neutrófilos, macrófagos y células NK, rápidamente infiltran el aloinjerto en respuesta a las señales inflamatorias y promueven el daño al aloinjerto, ya sea mediante sus propios mecanismos proinflamatorios o sosteniendo la actividad de las células T alorreactivas [35, 36].

Si bien el grado de rechazo depende de la histocompatibilidad entre el donante y el receptor, el tipo de alorrespuesta puede variar según el tipo de órgano trasplantado. Esto puede deberse a diferencias en el modo de revascularización, drenaje linfático, presencia de antígenos tejido-específico, su función inmunológica, así como el tamaño del aloinjerto [37].

3. DROGAS INMUNOSUPRESORAS

El proceso de inmunosupresión es de vital importancia para prevenir los mecanismos inmunológicos de rechazo con el objeto de garantizar una sobrevida del injerto lo más larga y sana posible, por lo que la introducción de fármacos inmunosupresores ha reducido la incidencia de rechazo agudo y crónico de forma considerable. El diseño de las drogas inmunosupresoras está basado en el conocimiento de los caminos moleculares que llevan a la activación de los linfocitos T, células centrales en la regulación de la respuesta inmunitaria (Figura 3).

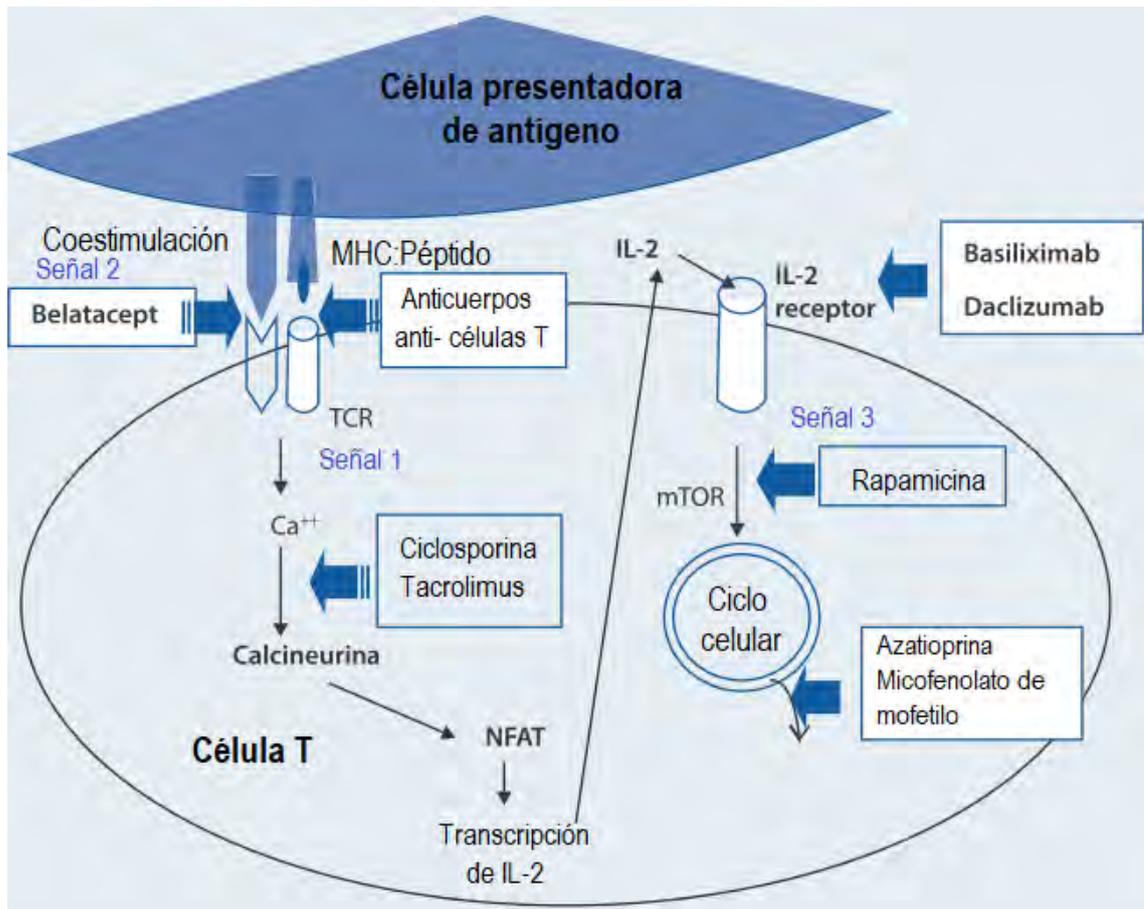


Figura 3. Sitios de acción de las drogas inmunosupresoras. Las drogas inmunosupresoras están diseñadas con el objetivo de bloquear cualquiera de las señales de activación de las células T [8].

Las drogas inmunosupresoras actúan en distintos niveles de la respuesta inmunológica frente al injerto, es por ello que la batería inmunosupresora cuenta con anticuerpos policlonales anti-linfocitos como Timoglobulina, Alemtuzumab (anti-CD52) y Rituximab, este último dirigido hacia las células CD20⁺ por lo que elimina la mayoría de los linfocitos B en circulación. También se tienen a los inhibidores de la coestimulación como Belatacept, los inhibidores de la vía Calcio/Calcineurina como Ciclosporina y Tacrolimus, los anticuerpos específicos contra el receptor de la IL-2 como Basiliximab y Daclizumab, los que interfiere con la vía de señalización intracelular mTOR del receptor de IL-2 como la rapamicina, los inhibidores de la

síntesis de novo de nucleótidos (purinas o pirimidinas) que impiden la proliferación como Azatioprina y Micofenolato de mofetilo, los que impiden el tráfico leucocitario como el anti-S1P receptor Fingolimid, y los medicamentos anti-inflamatorios como los glucocorticoides que después de unirse a sus receptores intracelulares, regula la transcripción de varios genes, alterando la función de la célula [34, 38].

Los fármacos inmunosupresores, además de permitir la tolerancia inmunológica de los injertos, producen efectos secundarios como la alta incidencia de infecciones y cáncer, debido a una falta de especificidad y efectos tóxicos sobre el mismo órgano. El problema de los inmunosupresores es que se trata de unos medicamentos de "amplio espectro" ya que los límites entre el nivel terapéutico y el nivel tóxico están muy próximos. Unos de los principales efectos es la nefrotoxicidad, es decir que pueden dañar al riñón y llevar a que el paciente tenga que entrar en diálisis. Otro de los factores de riesgo es el aumento de incidencia de infecciones, tumores, mortalidad cardiovascular, hipertensión arterial, que incide en el 40-70% de los pacientes trasplantados [39, 40]. A pesar de los avances producidos en los últimos años, la supervivencia del injerto a largo plazo no ha mejorado de forma significativa, de manera que a los 10 años del trasplante se ha perdido un 50% de los injertos; esto hace que cada vez sea mayor el número de pacientes que comienzan diálisis tras el fallo del injerto [41].

Por este motivo se están desarrollando nuevos fármacos que tratan de alcanzar un grado de inmunosupresión que permita la tolerancia del injerto sin los efectos indeseables de los inmunosupresores actuales. *Belatacept* es una proteína recombinante formada por el fragmento Fc de la inmunoglobulina humana y el dominio extracelular de CTLA-4, que actúa bloqueando la segunda señal de activación (CD80/86 y CD28)

para evitar la activación de las células T, produciendo anergia. Esta molécula ha demostrado su eficacia en el trasplante renal e islotes pancreáticos y se asocia a una menor incidencia de nefropatía crónica del injerto, y ofrece un perfil cardiovascular y metabólico más favorable que el de los inhibidores de la Calcineurina (CNI) como Ciclosporina y Tacrolimus [42, 43].

Sin embargo, estas drogas no son específicas, resultando es una serie de complicaciones que podrían ser potencialmente eliminadas si fuera posible alcanzar en el receptor un estado inmunológico de no respuesta o tolerancia que fuera específico para los aloantígenos del órgano trasplantado, sin la necesidad de una inmunosupresión farmacológica.

3.1 Alternativas al uso de drogas inmunosupresoras

Las alternativas más prometedoras a la inmunosupresión son estrategias que buscan inducir tolerancia inmune aloespecífica. Los mecanismos que participan en la tolerancia a los aloantígenos son al principio los mismos que frente a los autoantígenos, es decir la tolerancia es alcanzada controlando la reactividad de las células T por medio de dos procesos: la deleción clonal tímica, que es el principal mecanismo de tolerancia central, e implica la eliminación de células dirigidas contra antígenos propios, y la selección de aquellos que no son autorreactivas. Sin embargo, algunas células T autoreactivas pueden escapar de la tolerancia central, pero están controladas por diferentes mecanismos periféricos de tolerancia como la anergia, deleción y supresión [44, 45] .

La anergia se da cuando el linfocito T se activa de forma incompleta, es decir no recibe la segunda señal coestimuladora, induciendo un estado de no respuesta en la célula que se caracteriza por una represión activa de la señalización del TCR y

expresión del IL-2. Otros estudios además sugieren que la inactivación de la vía mTOR mediada por privación de nutrientes, ATP o hipoxia pueden estar implicados en la inducción de anergia en los linfocitos T [46]. Las moléculas coestimuladoras como PD-1 y CTLA-4 también pueden proveer de señales negativas que inhiben la respuesta de las células T, dado que su señalización recluta fosfatasa que limitan su activación o restringe su función efectora [47]. La delección se consigue mediante muerte celular por apoptosis, donde las vías Fas y Bim cumplen un papel fundamental. Las células T expresan Fas (CD95), y la expresión de su ligando FasL es inducida después de la estimulación repetida de los linfocitos T. La activación de Fas genera una señal que induce la activación de caspasas que promueven la apoptosis, esta vía es conocida como muerte celular inducida por activación. Bim es capaz de activar directamente a las proteínas Bax/Bak que a su vez forman poros en la membrana externa de la mitocondria liberándose proteínas mitocondriales al citosol que activan proteasas que a su vez inducen apoptosis [48]. La supresión es un mecanismo que lleva a cabo activamente la subpoblación de células T reguladoras que se generan en el timo así como las que se inducen en la periferia a partir de linfocitos T vírgenes [49].

Muchos trabajos han intentado ahondar en los mecanismos que producen esta tolerancia. Así por ejemplo, la inyección intra-tímica de antígenos solubles del donante es capaz de inducir tolerancia central. Otro, es la infusión de células hematopoyéticas del donante a un receptor pre-condicionado, de manera que el sistema inmune del receptor es parcial o totalmente reconstituido por las células del donante, generando un sistema inmune quimérico o bien ausencia de respuesta inmune específica contra el donante [50, 51]. Sin embargo, quedan por resolver muchos problemas como conseguir la depleción de las células alorreactivas periféricas que escapan de la delección central del quimerismo central conseguido con la transfusión de células de médula ósea. Por

ello, la participación de mecanismos extra-tímicos parece ser el factor más importante en la aceptación del injerto a largo plazo, y entre ellos la regulación inmunológica por parte de las células T reguladoras se postula como uno de los mecanismos predominantes.

4. CÉLULAS T REGULADORAS

Las células T reguladoras (Tregs) son un subtipo de linfocitos T CD4⁺ que presentan un papel crucial en el control de las enfermedades autoinmunes así como en el mantenimiento de la homeostasis después de la respuesta inmune, previniendo el desarrollo de inmunopatologías [49]. Estas células se caracterizan por expresar constitutivamente CD25 (cadena α del receptor de IL-2) y el factor de transcripción FOXP3, definido por diversos autores como el regulador maestro del desarrollo y función de las células T reguladoras, y considerado como el principal marcador molecular de esta subpoblación. La importancia de FOXP3 en el linaje de las Tregs está ilustrado en ratones y humanos con deficiencia en FOXP3, la cual conduce a una enfermedad autoinmune severa con hiperproliferación de las células T y muerte prematura [52, 53]. FOXP3 presenta tres dominios principales: un dominio N-terminal rico en prolina responsable de la represión transcripcional, el dominio ZL (dedos de zinc y leucina en cremallera) que facilita la formación de homodímeros o tetrámeros de FOXP3 o su asociación con otros factores de transcripción, y el dominio C-terminal, altamente conservado y responsable de su unión al DNA [54]. El dominio N-terminal juega un papel esencial en la actividad supresora de FOXP3, al regular la importación nuclear de FOXP3, la interacción con otros factores de transcripción y la estabilidad de FOXP3 a través de modificaciones post-traduccionales [55]. También se han descrito

otros marcadores asociados con el estado de maduración y actividad funcional de las Tregs como CD45RA, CTLA-4, CD62L, CCR7, LAG3, GITR, CD39 y CD103 [56].

Estas células se pueden generar en el timo, y se denominan células T reguladoras tímicas (tTregs; anteriormente referido como Tregs naturales [nTregs]) donde requieren de la combinación de fuertes señales antigénicas así como una alta coestimulación. Pero también se pueden generar en la periferia a partir de linfocitos T vírgenes después del encuentro con antígenos propios o foráneos, en condiciones de coestimulación limitante y en función de las citocinas presentes en el momento de la activación; estas células reciben el nombre de Tregs periféricas (pTregs) si se generan *in vivo* o Tregs inducidas (iTregs) si se generan *in vitro*. En este contexto, las células dendríticas CD103⁺ presentes en el tejido linfoide asociado al intestino (GALT) o en los nódulos linfáticos mesentéricos que drenan el intestino son capaces de inducir la expresión de FOXP3 en las células T CD4⁺ vírgenes, favoreciendo la generación de células pTregs, donde además de la coestimulación subóptima, participa la IL-2, TGF- β y ácido retinoico (vitamina A) [57, 58].

Las células T reguladoras tímicas se originan principalmente en la región de la médula tímica, aunque también se les han observado en menor proporción en la corteza. Las células epiteliales tímicas de la médula (mTECs) y las DCs son las principales células presentadoras de antígenos que participan en la diferenciación tímica de las Tregs. Las mTEC son capaces de expresar y presentar antígenos específicos de tejido cuya expresión está controlada por el regulador transcripcional AIRE (Autoimmune Regulator) [59]; entre las DCs tímicas se encuentran las DCs plasmacitoides y las DCs SIRP α ⁺ convencionales, que migran de la periferia por lo que pueden potencialmente presentar antígenos extracelulares capturados del microambiente periférico; y por último las DCs CD8 α ⁺ que se desarrollan intratímicamente y son definidas como

residentes [60]. Sobre la contribución de cada una de las APCs mencionadas en la generación de Tregs tímicas, se ha señalado que las mTECs son responsables del 50% de producción de tTregs, mientras que las DCs SIRP α^+ convencionales y DCs plasmacitoides median la producción del 50% restante de Tregs, aunque algunos señalan que sólo las mTECs y DCs SIRP α^+ serían las responsables en la producción de la gran mayoría de Tregs [61]. Si bien un trabajo reportó que las DCs CD8 α^+ son requeridas para la selección del 50% de TCR de las Tregs [62], el grupo de Herbin *et al*, señaló que este subtipo es dispensable para la producción de tTregs, aunque resalta su papel cooperativo único en conjunto con las mTECs en regular la selección tímica, que no puede ser compensado por las DCs SIRP α^+ convencionales and DCs plasmacitoides [63].

Se ha postulado que el desarrollo de las células T reguladoras requiere de un umbral de señalización a través de su receptor (TCR) mayor que el requerido para la selección positiva, pero no tan alto como para llegar a la muerte por apoptosis [64]. Lio y Hsieh propusieron un modelo de dos pasos sobre la diferenciación tímica de Tregs; según este modelo, una fuerte señal a través del TCR produce una sobre- expresión de CD25, incrementando la respuesta de los precursores tTregs CD25 $^+$ FOXP3 $^-$ a las señales IL-2, y como consecuencia se induce la expresión de FOXP3 [65].

4.1 Regulación de la expresión y estabilidad de FOXP3

El gen FOXP3 contiene una región promotora muy conservada entre humano y ratón, y tres secuencias de DNA no codificantes (CNS o “conserved non coding sequences”): CNS1, que contiene los elementos de respuesta a TGF- β y sitios de unión para NFAT y SMAD y está implicada en la expresión de FOXP3 inducida por TGF- β ; CNS2, contiene islas CpG y sitios de unión para CREB y STAT5 y es requerida para la

expresión estable de FOXP3; CNS3, región que contiene un sitio de unión para c-Rel que es requerido para la generación de tTregs [66].

La estimulación del TCR en conjunto con las moléculas coestimuladoras, activa varios factores de transcripción como NF- κ B, NFAT y AP-1 que subsecuentemente se unen al promotor o a regiones “enhancer” del gen FOXP3, contribuyendo a su expresión. La señalización a través de CD25 depende de la IL-2 que es secretada por los timocitos que pasaron por el proceso de selección tímica, o por las células T convencionales de la periferia, y su activación prende las vías PI3K y STAT5, siendo el STAT5 indispensable para el desarrollo de las tTregs y pTregs [67]. La vía PI3K, también puede ser activada vía TCR y CD28, pero se encuentra inhibida en las tTregs debido a que éstas expresan altos niveles de la fosfatasa PTEN, por lo que la inhibición farmacológica de PI3K promueve la diferenciación *in vitro* de las Tregs [68, 69] . Un factor determinante para el desarrollo de las Tregs es la baja activación de la vía PI3K/AKT, con el fin de mantener activos los niveles de Foxo1 y Foxo3, dos factores de transcripción que se unen al promotor y a la región CNS2 del gen FOXP3 y facilitan su expresión [70]. Otro factor importante durante el desarrollo de las tTregs es la señalización a través del TGF β , que es capaz de promover la supervivencia de las tTregs precursoras, dado que su ausencia conlleva a la alta expresión de moléculas proapoptóticas en las precursoras [71]. Por lo tanto, el camino que lleva a la generación de células tTregs es una mezcla delicada de señales donde la combinación adecuada de avidéz antigénica y señalización por citocinas genera una célula supresora con la capacidad de desarrollar un fenotipo estable y alta tolerancia a la apoptosis.

4.2 Otras células reguladoras

Adicionalmente, se han descrito otras células T $CD4^+FOXP3^-$ con capacidad supresora, que incluyen las células Tr1 y Th3, las cuales secretan IL-10 y TGF- β , respectivamente [72].

Las Tr1 fueron descritas por primera vez en 1997, como una subpoblación de las células T $CD4^+$ que suprimen la respuesta antígeno-específica de las células T y previenen la colitis [73] y para su identificación se han descrito las moléculas de superficie CD49d Y LAG-3 [74]. Diferentes grupos han demostrado que las Tr1 son capaces de regular la respuesta alérgica, suprimir el rechazo de injerto de piel y controlar enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) [75], por lo que en recientes años se está evaluando su aplicación clínica como terapia adoptiva para el tratamiento de IBD. Las Th3 tienen un papel significativo en la tolerancia oral a antígenos extraños y contribuyen a la supresión de la respuesta autoinmune.

También se han descrito diferentes subpoblaciones de células T $CD8^+$ capaces de inhibir la función inmune bajo ciertas condiciones [76], como las $CD8^+CD25^+FOXP3^+$ ($CD8^+$ Tregs) que han sido relacionadas con la regulación del IBD [77] y el control de la inflamación alérgica [78]. Las células T $CD8^+CD28^{lo/-}$, que son capaces de reducir la severidad del encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) después de su transferencia en ratones KO para CD8 [79], además de prevenir la inflamación intestinal en un modelo de colitis experimental [80]. Las células $\gamma\delta T$, que se encuentran principalmente en el epitelio del intestino y su actividad está asociada con la tolerancia en mucosas, regulación de la autoinmunidad e inmunidad tumoral mediante la producción de IL-10 y TGF- β de manera similar a las Tr1 [81, 82].

Por otro lado, están las células B reguladoras, que de manera similar a las Tregs mantienen la tolerancia y previenen la autoinmunidad. Entre las más investigadas se encuentran las células B productoras de IL-10, denominadas B10. Su principal

mecanismo es promover el desarrollo de las Tregs mientras suprimen a las efectoras vía producción de IL-10, que además pueden actuar sobre las APCs, regulando su activación [83].

4.3 Mecanismos de acción de las células T reguladoras

Las células T reguladoras pueden suprimir una variedad de células inmunes como las células B, NK, NKT, monocitos, DCs, además de células T convencionales CD4⁺ y CD8⁺. La proliferación y función de las células T convencionales puede ser inhibida por las Tregs de manera directa o indirecta. La primera mediante producción de moléculas inmunosupresoras y por contacto celular, y la segunda mediante inhibición de la capacidad estimuladora de las APCs (Figura 4). Para que una Treg se vuelva supresora debe ser activada mediante su TCR de manera antígeno-específico y en presencia de IL-2. Una vez activa, las Tregs pueden suprimir a las células T convencionales independientemente del antígeno, conocido como "supresión bystander" [84]. Las células T reguladoras pueden suprimir las respuestas inmunológicas a través de distintos mecanismos:

1. Producción de granzimas y perforinas, que induce citotoxicidad en las células T convencionales.
2. Disrupción metabólica mediante el consumo de IL-2 mediado por la alta expresión de CD25 de las Tregs. La IL-2 es importante para la supervivencia y proliferación de las células T convencionales.
3. Producción de adenosina, mediante hidrólisis de ATP o AMP extracelular mediada por las ectoenzimas CD39 y CD73 de las Tregs. La señalización de la adenosina a través de su receptor A2A, puede inhibir las funciones de las DCs y

células T efectoras por la elevación de los niveles intracelulares de AMP cíclico [85]

4. Secreción de citocinas inmunosupresoras como IL-10, IL-35 y TGF- β , que afectan negativamente tanto a las células T convencionales como a las APCs.
5. Supresión de la expresión de citocinas en las células T convencionales, vía inhibición de las señales de Ca²⁺ y consecuentemente reduciendo la activación de NFAT y NF κ B [86].
6. Modificación de la APC a través de mecanismos dependientes de contacto celular, como LAG-3 y CTLA-4 [87, 88] que atenúan la funciones de las APCs promoviendo anergia u apoptosis en la célula T efectora. LAG-3 interacciona con MHC-II suprimiendo la activación de las APCs, mientras la interacción de CTLA-4 a las moléculas CD80/86 induce la expresión deIDO que cataliza la degradación del triptófano a kinurenina con efectos supresores sobre las células T convencionales [89]. CTLA-4 también puede disminuir la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80/86 de las APCs, afectando su capacidad estimuladora.

La mayoría de los diferentes mecanismos de supresión descritos fueron basados en estudios de ensayos de supresión *in vitro*. Por lo que el mecanismo a predominar *in vivo* va a depender del tipo y estado de activación de la célula blanco, el estado de activación de las Tregs, así como la localización y el microambiente donde se lleva a cabo la reacción inmune.

Las Tregs pueden utilizar la maquinaria de desarrollo de las células T helper patogénica para suprimir una respuesta inmune. Por ejemplo T-bet, que es el factor de transcripción específico para Th1, es requerido por las Tregs para una supresión efectiva

de la inflamación dominada por las células Th1, puesto que T-bet media la expresión de CXCR3, que es crucial para su acumulación en estos sitios de inflamación. La inhibición de la expresión de citocinas efectoras patogénicas de las Th1 estaría regulada por FOXP3 [90].

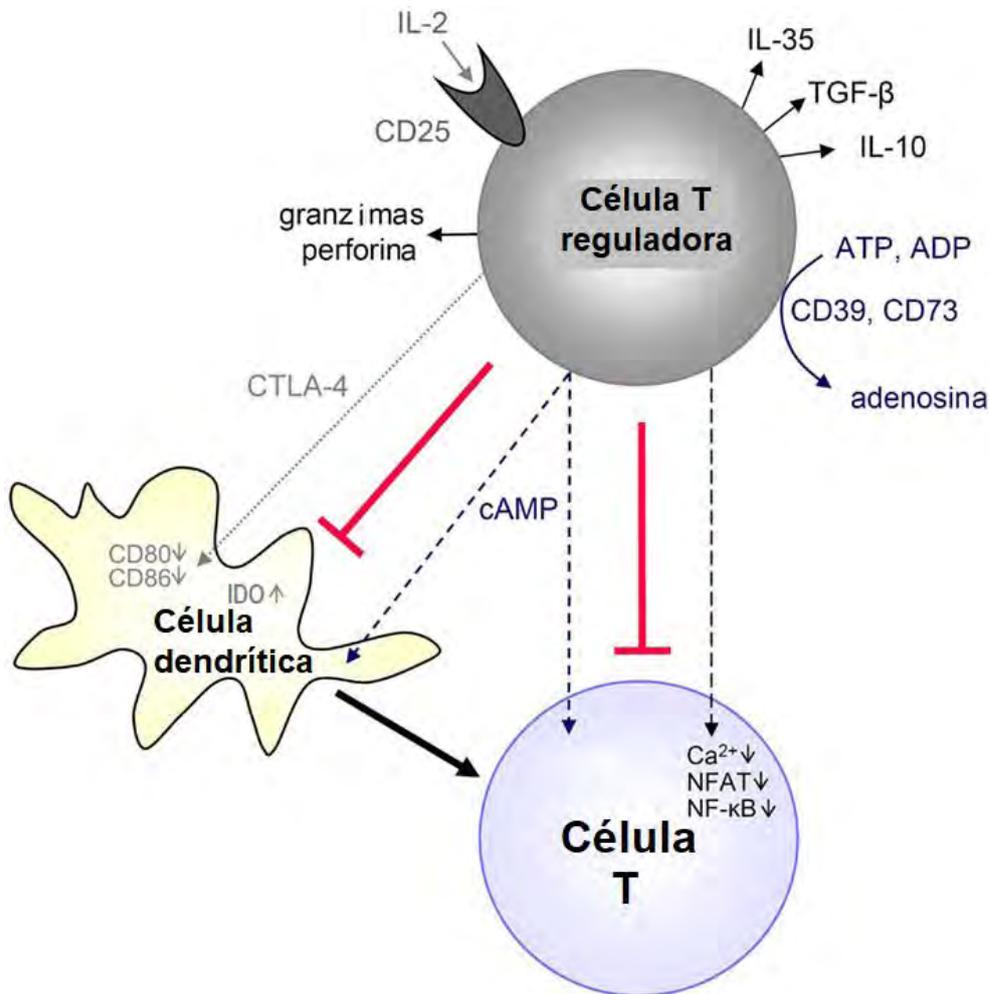


Figura 4. Mecanismos de acción de las células T reguladoras. La proliferación y función de las células T convencionales puede ser inhibida por las Tregs de manera mediante producción de moléculas inmunosupresoras y por contacto celular o indirectamente inhibiendo la capacidad estimuladora de las APCs [91].

La capacidad supresora de las células T reguladoras es dependiente de su migración y retención en el microambiente donde la regulación es requerida, ya que expresan múltiples moléculas implicadas en el tráfico celular y la retención en el tejido inflamado como selectinas (CD62L), integrinas ($\alpha4\beta7$) y receptores para quimiocinas (CCR4,

CCR5, CCR7 y CCR9) [92]. Así, en condiciones homeostáticas las Tregs están presentes en los órganos linfoides, mientras que durante la inflamación migran a tejidos periféricos no linfoides para ejercer su función supresora, tanto de la inducción como de la fase efectora de una respuesta inmune. La migración de las Tregs a los nódulos linfáticos, previa activación en los sitios inflamatorios, les permite adquirir las capacidades inmunes supresoras, dado que la deficiencia de CD62L o CCR7 en las Tregs conlleva a una reducción en su función supresora y por ende en la prevención de la autoinmunidad o rechazo del aloinjerto [93, 94].

4.4 Células T reguladoras tímicas y periféricas

Aunque las dos subpoblaciones de Tregs (tímicas y periféricas) se desarrollan en distintas localizaciones anatómicas, ambas comparten receptores de superficie que están asociados a su función, incluyendo CTLA-4, GITR, CD103 e ICOS [72]. Sin embargo, las tTregs se pueden distinguir de las pTregs y de las Tregs generadas *in vitro* (iTregs) porque las primeras expresan altos niveles de Helios y Neuropilina [95, 96]. Sin embargo, otros grupos señalan que Helios también pueden ser expresado en las pTregs/iTregs u otras poblaciones de células T efectoras [97], y Neuropilina se puede expresar en pTregs que se desarrollan en un contexto de inflamación crónica [98]. Además, los mecanismo de supresión pueden diferir entre ambos subtipos: las pTregs/iTregs suprimen principalmente vía producción de citocinas inmunosupresoras mientras que las tTreg usan principalmente mecanismos por contacto celular para ejercer su supresión [99, 100].

Ambas subpoblaciones de Tregs tímicas y periféricas tienen la región TSDR ubicada en el CNS2 del gen de FOXP3 desmetilada [101, 102], la cual es responsable del mantenimiento de la expresión de FOXP3, por lo que comparten un patrón global de

expresión génica, estabilidad y fenotipo. Estudios recientes han revelado que ambas subpoblaciones de Tregs no sólo presentan desmetilada la región TSDR del gen FOXP3, sino también de otros genes como TNF-rs18, CTLA-4, Ikzf4 e IL-2ra, estableciendo un patrón de hipometilación CpG específica de las Tregs, que está asociado con el aumento y estabilización de la expresión de FOXP3 así como la inducción de la expresión de genes independientes de FOXP3 [103]. Por el contrario, las Tregs generadas *in vitro*, presentan la región TSDR del gen FOXP3 metilada, lo que explica su inestabilidad [104]. Por ello, las iTregs generadas *in vitro* no pueden replicar el verdadero fenotipo de las Tregs generadas en la periferia.

5. CÉLULAS T REGULADORAS Y LA TOLERANCIA AL ALOINJERTO

En modelos murinos hay numerosas evidencias del papel crítico de las células T reguladoras en la tolerancia hacia aloinjertos. En un modelo de trasplante alogénico de médula ósea se ha reportado que la co-transferencia de células T CD4⁺CD25⁺ y células T CD4⁺CD25⁻ retardan el inicio de la enfermedad injerto contra huésped [105], así como el rechazo del aloinjerto en un modelo de trasplante alogénico de piel, al ser co-transferidas a un ratón deficiente de células T [106]. Por ello, se ha propuesto que la aceptación de trasplantes en humanos también está asociada con la regulación inmunológica por parte de estas células, que podrían influir en el curso del trasplante y su aceptación a largo plazo [5].

Existen varios reportes que sugieren la participación de las Treg en el mantenimiento de la tolerancia al trasplante. Un estudio sobre poblaciones periféricas de células T CD4⁺CD25⁺ en pacientes con trasplante renal señaló que los pacientes sobrevivientes a largo plazo tienen un porcentaje incrementado de células T CD4⁺CD25⁺ totales circulantes al compararlos con pacientes en proceso de rechazo

crónico del injerto, pacientes en diálisis o pacientes con sobrevida del injerto a corto plazo [107]. Otro trabajo reportó que los pacientes con rechazo crónico tienen menos células T CD4⁺CD25^{high} y ausencia de transcritos FOXP3 en comparación con pacientes tolerantes e individuos sanos [108], lo que sugiere que las células T reguladoras no sólo contribuyen al mantenimiento de la tolerancia a antígenos propios y regulación de la respuesta inmune contra antígenos extraños, sino que también pueden funcionar limitando la respuesta alorreactiva.

Existen evidencias en modelos murinos que las Tregs migran al injerto para evitar su rechazo. Zhang *et al* mostró en un modelo de trasplante de islotes pancreáticos, que las Tregs migran primero de la sangre al aloinjerto, donde son activadas, y subsecuentemente a los nódulos linfáticos de drenaje de manera dependiente de CCR2, CCR5 y CCR7, donde inhiben la migración de las células dendríticas y suprimen la respuesta inmune aloantígeno-específica [109]. Por otro lado, un trabajo posterior demostró que las Tregs expresan la linfotoxina $\alpha\beta$, cuyo receptor presente en las células endoteliales linfáticas, permite que migren de los aloinjertos a los nódulos linfáticos [110]. Además, se reportó que las tTregs y pTregs tendrían diferentes patrones de migración, mientras que las pTregs de manera similar a las células T efectoras se generan en los nódulos linfáticos antes de migrar al injerto, las tTregs, de manera similar a las células T memoria, pueden migrar directamente al tejido inflamado para ejercer su función supresora [111]. Estudios en humanos reportaron presencia de Tregs en el hígado, corazón, piel injertado y que ellos específicamente controlan las respuesta inmune a los aloantígenos del donante [112-114] y que la presencia de células FOXP3⁺ en el injerto estaría asociado con un mejor resultado clínico en pacientes estables con signos de rechazo agudo [115].

6. IMPACTO DE LAS DROGAS INMUNOSUPRESORAS SOBRE LAS CÉLULAS T REGULADORAS

Un factor a considerar respecto a las células Tregs en el trasplante de órganos sólidos es su coexistencia con fármacos inmunosupresores, esenciales para evitar las crisis de rechazo agudo y crónico. Si bien estas terapias han mostrado ser parcialmente exitosas, no existe todavía mucha información sobre cuál es su impacto en el mantenimiento y función de las células T reguladoras en el individuo trasplantado [116]. Un requerimiento crítico para la función y expansión de Tregs es la producción de IL-2 que es dependiente de la calcineurina [117], la cual es afectado por los inhibidores de la calcineurina (CNI), además que se requiere la interacción de NFAT y FOXP3 para los efectos supresores de las Tregs, por lo que la interferencia del NFAT por parte de la CsA, puede contribuir a los efectos observados de la CsA sobre la biología de las Tregs [118] y esto ha sido confirmado en varios estudios clínicos, como el efecto negativo de CNI reportado sobre la frecuencia y función de las Tregs circulantes de pacientes con trasplante renal al compararlos con pacientes en hemodiálisis y controles [119], además del incremento en la expresión de FOXP3 después de 4 meses de discontinuar el tratamiento con CNI [120]. Caso contrario es la rapamicina, que al inhibir la vía PI3K/AKT/mTOR puede favorecer la expansión y conversión de Tregs, además de incrementar su función supresora [121]. En pacientes con trasplante renal, la inmunosupresión con rapamicina está asociada con un incremento en la proporción de Tregs al compararlos con pacientes inmunosuprimidos con CNI [122]. Aunque también se reportó que pacientes tratados con una baja dosis del Tacrolimus junto con micofenolato de mofetilo (MMF) favorece la inducción y expansión de Tregs que llegan acumularse en el aloinjerto [123], por lo es posible que bajas concentraciones de

inhibidores de calcineurina condicionen un ambiente favorable antes de la infusión de las Tregs.

Por otro lado están los inhibidores de la coestimulación como Belatacept que podrían tener un efecto negativo sobre la generación y supervivencia de las Tregs tímicas y periféricas, dado que la Tregs requieren de la señal a través del CD28 para su desarrollo y homeostasis [124]. Aunque existen reportes que señalan un incremento de episodios de rechazo agudo y desórdenes linfoproliferativos post-trasplante en pacientes tratados con Belatacept [125], estudios clínicos señalan que a los 6 meses de recibir Belatacept, los pacientes con trasplante renal presentan una mejor función renal, una menor incidencia de nefropatía crónica del injerto, así como un mejor perfil metabólico y cardiovascular [126]. Además, después de 7 años de trasplante renal, los pacientes bajo tratamiento con Belatacept presentan un menor riesgo de muerte y pérdida del injerto, reducción en la frecuencia de anticuerpos anti-donante y un incremento en la tasa de filtración glomerular, al compararlo con pacientes tratados con Ciclosporina [43].

Algunos trabajos señalan que Belatacept podría actuar más como un inmunomodulador que como un inmunosupresor, dado que pacientes bajo tratamiento con Belatacept mostraron un incremento de células IDO/CD16⁺ y células FOXP3⁺ en el injerto renal [127, 128], así como un aumento de poblaciones circulantes de células CD16⁺/IDO⁺, CD19⁺/IL10⁺, CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ y pDC/IDO⁺, al compararlos con Ciclosporina [129], lo que sugiere que Belatacept estaría condicionando un estado de tolerancia en aquellos pacientes trasplantados. Otros estudios no reportaron diferencias en el porcentaje de CD4⁺CD25^{hi} y en los niveles de FOXP3 dentro de la subpoblación de CD4⁺ entre pacientes con BLT y CsA después de 6 meses de tratamiento [130] además que no tiene ningún efecto a corto ni largo plazo en el número y función de

Tregs circulantes, más bien se evidenció un incremento de células FOXP3⁺ en biopsias renales de pacientes con episodios de rechazo [131]. Por el contrario, otros estudios señalaron un menor porcentaje de células CD4⁺CD25^{hi} circulantes y menores niveles de mRNA para FOXP3 en biopsias del injerto renal en pacientes bajo tratamiento con Belatacept durante 12 meses al compararlos con CsA [132], por lo que el efecto de esta droga sobre la frecuencia y función de las células T reguladoras aún queda por determinar.

Debido al papel crítico de las Tregs en el mantenimiento de la tolerancia a antígenos propios y extraños, es importante el desarrollo de estrategias en la terapia inmunosupresora que permita la supervivencia de las células Tregs en el paciente trasplantado, el régimen inmunosupresor puede incluir globulina anti-timocítica, el cual se reportó que preferencialmente preserva y promueve la expansión/generación de las Tregs [133] y rapamicina, el cual promueve la expansión selectiva de Tregs *in vivo* [134]. En pacientes con trasplante hepático, la adición de rapamicina al régimen inmunosupresor convencional (azatioprina, CNI, prednisona) resultó en un incremento del porcentaje de Tregs circulantes [135], además que en pacientes con trasplante renal, la adición de la inmunoglobulina anti-timocítica (ATG) al régimen estándar de micofenolato, tacrolimus y prednisona, resultó en una modificación del compartimento de las células T con una preponderancia significativa de las células T reguladoras al compararlos con los pacientes que no recibieron ATG en el momento del trasplante [136].

7. ESTRATEGIAS DESARROLLADAS PARA LA UTILIZACIÓN EFICAZ DE CÉLULAS T REGULADORAS EN LA INMUNOTERAPIA

7.1 Caracterización y purificación de Tregs

A pesar que se ha demostrado la capacidad de las células T reguladoras en suprimir el rechazo al aloinjerto en modelos experimentales, la baja frecuencia de estas células (1-3% de las célula T humanas) comparada con la mayor frecuencia de células alorreactivas efectoras, y que una supresión efectiva requiere una proporción adecuada de células Tregs y células T efectoras, ha motivado el desarrollo de un amplio número de estrategias que permitan su expansión *in vitro*, con la intención de re-infundirlas y utilizarlas para la inmunoterapia. Toda estrategia de expansión requiere aislar una población de Tregs con alto grado de pureza. Las células T reguladoras pueden ser aisladas en base a la alta expresión de CD25, pero en humanos esto puede incluir células T convencionales contaminantes, por lo que se han propuesto otros marcadores para aislar poblaciones de Tregs más puras y garantizar una potente función supresora, especificidad y estabilidad epigenética; entre ellos está la adición de CD45RA, para obtener Tregs “naïve”, cuya capacidad supresora y estabilidad funcional son mejores que solo las CD25^{hi} totales [137], además que esta población no pierde la desmetilación dentro de la región no codificante del gen FOXP3 (TSDR) después de tres semanas de expansión *in vitro*, que es crucial para mantener la expresión de FOXP3 en las Tregs, confirmando su estabilidad durante su expansión *in vitro* [138]. Sin embargo, separar Tregs “naïve” en los pacientes tiene el inconveniente de que esta población disminuye con la edad, llegando a ser incluso impráctico su aislamiento. Otro de los marcadores propuesto es la expresión de CD127, que está inversamente correlacionado a la expresión de FOXP3 en Tregs humanos [139]; la expansión de Tregs, aisladas con base a la baja expresión de CD127 (CD4⁺CD25⁺CD127^{lo}), fueron más potentes que las CD4⁺CD25^{hi} en inhibir la arterosclerosis del trasplante de arterias humanas en un modelo de ratones humanizados [140]. Entre otros marcadores de purificación reportados están: la ectoenzima CD39 como una alternativa a CD25, dado que las

células CD4⁺CD39⁺ son en su mayoría CD25^{hi}FOXP3⁺ [141]; la glicoproteína rica en repeticiones de leucina GARP, que es muy expresado por las Tregs activadas [142]; o por el contrario la no expresión de la cadena α de la integrina CD49d y la serina proteasa CD26 [143, 144]. Si bien se sabe que una alta pureza de Tregs es esencial para una eficiente expansión, conseguirlo sería difícil y no práctico debido a la reducción de células al inicio de cultivo como resultado del uso de muchos marcadores, con el riesgo de empeorar su funcionalidad debido a la necesidad de más ciclos de re-estimulación para alcanzar el número adecuado para su utilización clínica [138].

7.2 Expansión de células T reguladoras

Entre los protocolos propuestos para la expansión de células T reguladoras tímicas se han descrito como uno de los métodos más eficientes la utilización de perlas cubiertas con anti-CD3 y anti-CD28, suplementado con IL-2 [145], así como la adición de rapamicina y ácido retinoico (ATRA) en los cultivos celulares para favorecer la expansión de las Tregs con fenotipo y función estable. La rapamicina es un inhibidor de la vía mTOR (blanco de la rapamicina en mamíferos), cuya señalización en las tTregs se encuentra disminuida por la alta expresión de la fosfatasa PTEN un regulador negativo de la vía PI3K/AKT/mTOR [121]. Se reportó que la adición de rapamicina a los cultivos previene el crecimiento de células T efectoras contaminantes, asegurando la selección de una población Tregs más pura que mantienen su capacidad supresora [146] y un fenotipo estable al inhibir el desarrollo de células Th17 cuando las Tregs son expuestas en un ambiente que “favorece las TH17”, es decir permite la expansión de aquellas subpoblaciones de Tregs no plásticas [147]. Por otro lado, se ha reportado que ATRA ayuda a estabilizar la expresión de FOXP3, incrementando la acetilación de histonas en el promotor y región TSDR del gen FOXP3, además de prevenir que tTregs se

conviertan en células Th1/Th17 y sostener sus funciones supresoras en un ambiente inflamatorio [148].

Existen muchos ensayos clínicos que usan Tregs tímicas en terapia celular para el tratamiento y prevención de la enfermedad injerto contra huésped, pero ninguno de ellos mostraron toxicidad funcional; sin embargo el principal obstáculo de estos ensayos es obtener el número suficiente de células, la falta de marcadores adecuados específicos para su adecuada purificación, y por último que las Tregs aisladas de los pacientes pueden portar defectos intrínsecos que interfieren con su función supresora, haciéndolos no adecuados para su uso en la inmunoterapia [149]. Estudios en humanos reportaron que muchas enfermedades autoinmunes muestran alteración en la frecuencia y función de las Tregs. Pacientes con Lupus eritematoso sistémico activo muestran una reducción en el número de Tregs [150], otro estudio señaló que en pacientes con esclerosis múltiple, el número de Tregs CD4⁺CD25⁺ no está alterado pero su actividad supresora de estas células está marcadamente reducida [151], y en pacientes con artritis reumatoide la función de las Tregs se encuentra alterada al no poder suprimir la producción de citocinas como IFN- γ debido a una reducción de la expresión de CTLA-4 por estas células [152]. En un escenario de trasplante de órganos, están los efectos reportados de las drogas inmunosupresoras sobre las Tregs, como los inhibidores de calcineurina (CNI), donde pacientes con trasplante hepático y renal presentaron una reducción en el número, función y fenotipo de sus células T reguladoras al compararlos con los pacientes bajo tratamiento con rapamicina [153]. Por otra parte, también se observó una reducción en el número y función de las Tregs de pacientes en espera de un trasplante renal, probablemente debido a los factores urémicos y al continuo estado de activación inmune [154].

7.3 Conversión de células T reguladoras inducidas a partir de linfocitos T vírgenes

Por otra parte, dado que las células T vírgenes son muy abundantes en el organismo, varios grupos están intentando generar Tregs, induciendo la expresión de FOXP3 en células CD4⁺CD25⁻CD45RA⁺, debido a que FOXP3 es necesario para las funciones supresoras. Los principales factores identificados y cruciales para la expresión de FOXP3 en las CD4⁺CD25⁻ son IL-2 y TGF-β, con o sin ácido retinoico y rapamicina [155]. La señalización del TGF-β promueve la unión del NFAT y SMAD3 a una región altamente conservada del gen FOXP3 (CNS1) que funciona como "enhancer", que a su vez estimula la acetilación de la histona y la transcripción del FOXP3 [156]. Además, TGFβ antagoniza la actividad del DNA metiltransferasa Dnmt1, facilitando la inducción de FOXP3 en las células T convencionales [13]. Por otra parte, se ha reportado que TGFβ controla de la diferenciación de las células T "naïve" a Tregs o TH17 a través del inhibidor del DNA Id3, dado que la ausencia de este inhibidor en las células T "naïve" conlleva a que se diferencien preferencialmente a TH17 y esto fue atribuido a dos factores: la no unión del factor de transcripción EA2 y la incapacidad de suprimir la unión de GATA-3 al promotor de FOXP3, impidiendo su transcripción [12].

La rapamicina, además de inhibir la vía mTOR, aumenta la señalización de TGF-β inhibiendo al SMAD7, un regulador negativo del receptor del TGF-β [157, 158]. El ácido retinoico (ATRA) es el metabolito activo de la vitamina A y tiene un papel muy importante en la regulación inmune principalmente en la diferenciación de las células T reguladoras, que fue demostrado observando la capacidad de las células dendríticas de la mucosa en inducir la diferenciación a Tregs, a través de la producción de TGF-β y ácido retinoico [53]. La manera como actuaría ATRA sería incrementando la señalización del SMAD3 promovido por el TGF-β, inhibiendo citocinas proinflamatorias de las células T de memoria y la expresión de receptores para IL-6 e IL-23 los cuales dirigen el desarrollo de células TH17, e incrementando la metilación y

acetilación de histonas en el promotor y secuencia no codificante CNS2 del gen FOXP3, favoreciendo la expresión y mantenimiento de FOXP3 [159-161]. Por otra parte, también es probable que ATRA promueve la inducción de Tregs al inhibir GATA-3, dado que se reportó como un represor transcripcional de FOXP3 por unión directa al promotor [14]. Aunque también se postula que GATA3 sería un regulador positivo de FOXP3 al unirse a la región CNS2 (Figura 5) [28].

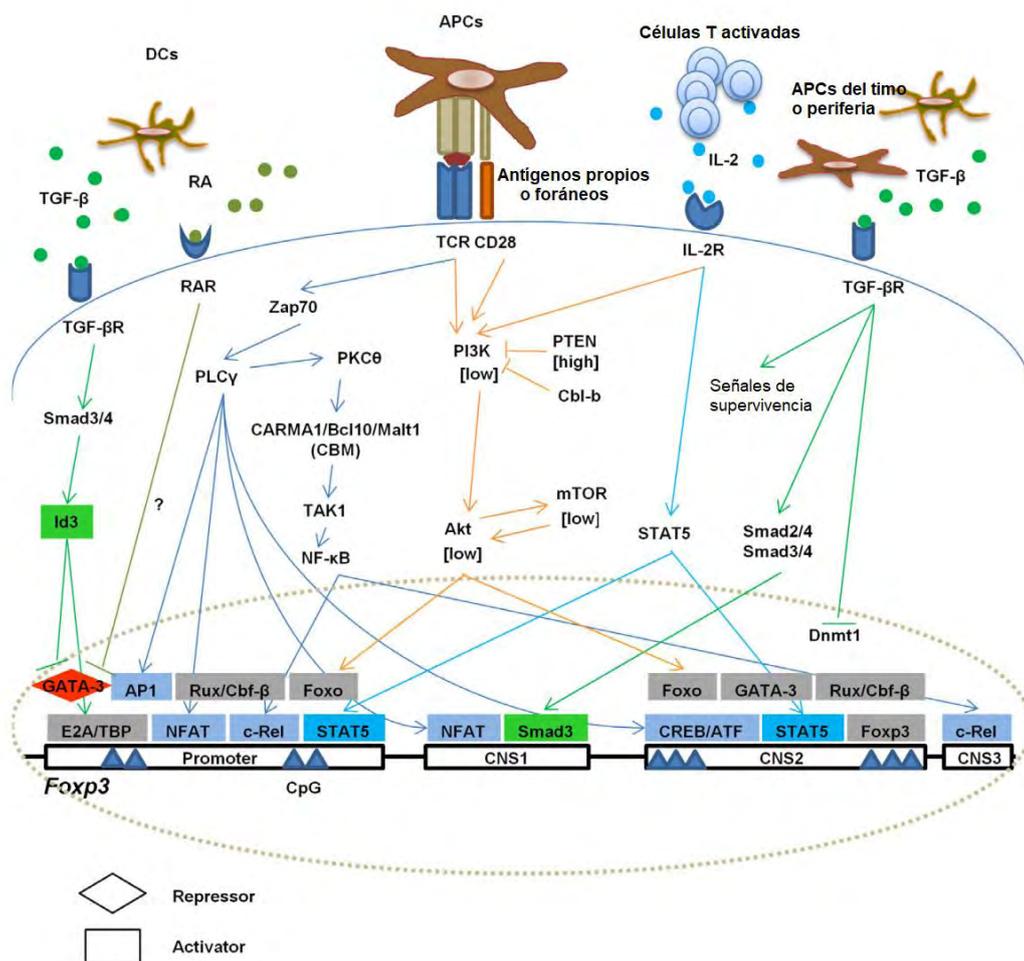


Figura 5. Vías moleculares para el desarrollo y estabilidad de las Tregs. Ambas subpoblaciones de Tregs requieren para su desarrollo de la activación a través del TCR en presencia de citocinas esenciales. La transcripción de FOXP3 depende de la unión de factores de transcripción al promotor y las 3 regiones no codificantes (CNS). CNS1 es necesario para la generación de pTregs, CNS2 regula la expresión de FOXP3 y contribuye a su estabilidad, y CNS3 es esencial para el desarrollo de tTregs [26].

7.4 Generación de células T reguladoras antígeno-específicas

Los protocolos desarrollados para la expansión/ generación de Tregs emplean en su mayoría perlas cubiertas con anti-CD3/CD28 o APC artificiales, obteniéndose un gran número de células Tregs policlonales con actividad supresora. Si bien múltiples modelos murinos han demostrado que las Tregs tímicas policlonales son capaces de proteger de la autoinmunidad y rechazo del aloinjerto [162, 163], estudios *in vitro* señalan que la actividad supresora de las Tregs requiere de una activación a través de su receptor TCR [164]. En un modelo murino de diabetes autoinmune se demostró que las Tregs antígeno-específicas expandidas fueron capaces de prevenir y revertir la diabetes en ratones NOD y fue más eficiente que las Tregs policlonales [165]; lo mismo se observó en un modelo de ratón humanizado con trasplante de piel alogénico, donde la infusión de Tregs aloantígeno específicas resultó en una reducción significativa del daño tisular [166], y estudios de su función *en vitro* señalaron que las Tregs antígeno-específicas son 100 veces más potentes que las policlonales y las Tregs no expandidas [167]. Esto sugiere que la función de las Tregs y la tolerancia órgano-específica es críticamente dependiente de la especificidad antigénica de las Tregs, además que el empleo de Tregs antígeno-específicas puede evitar los efectos deletéreos de la transferencia de un gran número de Tregs policlonales, dado que estas células se expanden de un “pool” existente con una amplia gama de reactividad en vez de selectivo hacia los aloantígenos, que podría resultar en una supresión inmune general.

Las Tregs aloespecíficas pueden ser expandidas usando como APCs a las DCs, células B o incluso PBMC totales. Algunos lograron expandir Tregs aloespecíficas humanas dentro de las normas de “Buenas prácticas de manufactura” (GMP) para poder ser usadas en la terapia clínica, usando DCs alogénicas en presencia de IL-2, IL-15 y rapamicina [168] o células B activadas con CD40L [169].

La habilidad de las DCs para procesar y presentar múltiples epítopes las hace candidatas ideales para la generación de Tregs específicas para el antígeno. Las células dendríticas son APC profesionales, consideradas mediadoras esenciales de la inmunidad y tolerancia. Según las señales que recibe, las DCs inmaduras pueden selectivamente ser estimuladas para diferenciarse en DCs inmunogénicas o tolerogénicas [170]. En condiciones homeostáticas las DCs se mantienen en estado inmaduro, hasta recibir las señales inflamatorias que promueven su activación mediante la sobre-regulación de marcadores coestimuladores como CD80, CD83, CD86 y CD40 facilitando la activación y expansión de las células T [171].

Las DCs inmaduras presentan una baja expresión de moléculas coestimuladoras y modestos niveles de MHCII en su superficie. Se ha establecido que la principal función de las DCs inmaduras *in vivo* y en condiciones homeostáticas es capturar y procesar antígenos en la periferia y que este proceso mantendría la tolerancia a los antígenos propios. En efecto, varios reportes señalan que la presentación de antígenos a las células T por parte de las DCs inmaduras resulta en anergia o inducción de Tregs [172]. Las DCs mantiene la tolerancia a través de varios mecanismos que son dependientes de IL10, TGF- β , ácido retinoico,IDO y vitamina D, donde varios de estos mecanismos se emplean para la inducción de Tregs como las Tr1, FOXP3⁺, TH3 y las células T dobles negativas [173, 174].

Si bien existen dos subpoblaciones generales de DC en sangre periférica humana, plasmacitoides y mieloides, estas representan menos del 2% de leucocitos periféricos, que dificulta su aislamiento para estudiar sus funciones, por este motivo, se utilizan las DCs diferenciadas de monocitos como un modelo de estudio *in vitro*, que poseen similares funciones y receptores al compararlas con las DCs *in vivo* [175]. La expansión *in vitro* de tTregs se encuentra favorecida por el empleo de DCs maduras [176], a

diferencia de iTregs donde los cocultivos con DC inmaduras o cierto estado de maduración favorecen su generación [177]. Un estudio comparativo entre las DCs derivadas de monocitos inmaduros (GMSCF e IL4) y maduros (GMSCF, IL4 y ligando para TLR3 poly I:C) señaló que las primeras fueron capaces de generar una población de células T CD4⁺ TGF-⁻/IL10⁺ capaces de inhibir la producción de IFN- γ en cocultivos con unas células específicas para pp65CMV [178].

Además de la importancia de las Tregs antígeno-específicas en prevenir el rechazo de órganos, también se debe considerar el tipo de aloespecificidad que va a regular. En un escenario de trasplante de órganos, la presentación directa es la vía predominante de alorreconocimiento y responsable de la pérdida temprana del aloinjerto, sin embargo esta vía disminuye con el tiempo predominando la vía indirecta, asociándola con la disfunción tardía del aloinjerto [179]. Existen muchos avances en la propagación de Tregs con aloespecificidad directa usando APCs del donante, como las células dendríticas, células B o incluso PBMC totales, sin embargo un control total del alorrechazo (agudo y crónico) requeriría de Tregs con ambas aloespecificidades [180, 181].

8. ¿CÉLULAS TREGS TÍMICAS EXPANDIDAS O TREGS GENERADAS DE NOVO PARA LA INMUNOTERAPIA EN TRASPLANTE?

Las contribuciones de ambas subpoblaciones de Tregs (tímicas y periféricas) en la regulación inmune no son redundantes y se requieren ambas funciones para suprimir la respuesta inmune. Un trabajo reportó que sólo la transferencia de ambas subpoblaciones en ratones neonatos deficientes en FOXP3, reduce la linfo-proliferación, producción de citocinas proinflamatorias e infiltración tisular. Análisis del repertorio del TCR mostraron que las pTregs pueden reconocer diferentes antígenos de las reconocidas por

las tTregs, que explicaría por qué ambos son indispensables para el mantenimiento de la tolerancia [100, 182]. Otro estudio compara las habilidades de ambas subpoblaciones capaces de reconocer el mismo antígeno y señalan que las Tregs generadas *in vitro* e *in vivo* son superiores a las tTregs para suprimir la respuesta alérgica TH2 en un modelo con asma, supresión que es disminuida cuando se neutraliza IL-10 [183]; estos datos resaltan la importancia de conocer la subpoblación adecuada de Tregs que mejor funcionarían en un escenario específico de terapia celular, como es el trasplante de órganos.

Algunos estudios señalan que las pTregs tienen un papel fundamental en el control de la respuesta aloinmune y mantenimiento de la tolerancia. Durante el desarrollo de las células T, los timocitos que mediante su TCR reconocen los auto-antígenos con alta avidéz relativa son seleccionadas como tTregs. Estas características llevan a interpretar que las tTregs están más dirigidas en asegurar una tolerancia a antígenos propios siendo importantes en la prevención de la autoinmunidad, mientras que las pTregs moderan la respuesta hacia ciertos antígenos extraños, como las que se encuentran en la microbiota intestinal y el feto durante el embarazo [184]. En ratones deficientes de CNS1 se reportó una creciente reabsorción fetal con infiltración de células inmunes [185]. El CNS1 es una región no codificante de FOXP3 que es esencial para la generación de pTregs pero dispensable para las tTregs [186], sugiriendo que la pTregs son un subtipo predominante en la supresión de la respuesta inmune hacia el feto, y defectos en pTregs pueden contribuir a la patogénesis de pre-eclampsia [187]. Además, que las Tregs generadas *in vitro* son superiores que las tTregs para migrar a los sitios de inflamación. Un estudio reportó que las iTregs pero no las tTregs interactúan eficientemente con las selectinas endoteliales y transmigran a través de las monocapas endoteliales *in vitro*; además las iTregs se adhieren al endotelio inflamado *in vivo* y sus productos de secreción bloquean

la inflamación aguda, estos datos soportan el concepto que las iTregs FOXP3⁺ son activas en tejidos inflamatorios y además ayudan a regular la inflamación por supresión directa de la activación endotelial y reclutamiento de leucocitos, independientemente de su influencia sobre las células T efectoras [188]. Varios estudios en modelos murinos señalan que las iTregs inducidas por TGF- β podrían funcionar más efectivamente que las tTregs en un ambiente inflamatorio, se reportó que las iTregs pero no las tTregs son resistentes a la conversión a Th17 cuando es tratado con IL-6, que además disminuye su actividad supresora [189], que las tTregs son inefectivas en tratar la gastritis autoinmune mediada por células TH17 [190] y que las células tTregs transferidas en un modelo de artritis inducida por colágeno disminuyeron la expresión de FOXP3 y Bcl-2, disminuyeron su actividad supresora y muchos de ellos se convirtieron a células Th17, a diferencia de las iTregs que fueron más resistentes a la conversión [191]. Estos resultados indican que las iTregs son más estables y funcionales en condiciones de inflamación y pueden tener una gran ventaja en tratar enfermedades autoinmunes e inflamatorias al compararlas con las tTregs. En un escenario de trasplante de órgano el rechazo es causado por la respuesta inmune hacia los antígenos del injerto que son percibidos como extraños por los receptor, dando como resultado una reacción inflamatoria en el injerto que debe ser controlado con el fin de mejorar la función y supervivencia del injerto [192]. Consistente con esto, es posible que las iTregs regulen la respuesta autoinmune más eficientemente, aunque aún quedan muchas interrogantes por aclarar. Un reporte reciente resalta el papel crítico de la pTregs en la inducción de tolerancia al aloinjerto, dado que encontraron que las pTregs (identificados como Nrp-1⁻) de ratones receptores de “alto riesgo” (por inflamación local previa causado por suturas en el órgano) con trasplante de córnea fueron menos supresoras y en menor número en comparación con las de “bajo riesgo”, y que la transferencia adoptiva de las

pTregs de receptores “de bajo riesgo” a receptores de “alto riesgo” son capaces de inducir tolerancia; estos datos señalan que la función disminuida de las pTregs pero no de las tTregs media la pérdida de tolerancia inmune y promueve el rechazo del aloinjerto [193]. Algunos de los trabajos que comparan la eficacia de las iTregs con las tTregs en diferentes escenarios se resumen en la tabla 1.

Estrategia de inducción	Modelo	Estrategia de infusión	Resultados	Referencias
Células del Timo CD4+CD25- + esplenocitos irradiados + CD3/CD28 + TGF-β + IL-2 (5 días)	Ratones nu/nu con gastritis autoinmune mediante transferencia de cells Th17.	Co-transferencia de 50x10 ³ células T efectoras Th17 y 1X10 ⁶ células inducidas	La co-transferencia de las nTregs o iTregs policlonales junto con las Th17 no previene el desarrollo de una gastritis destructiva. La co-transferencia de las iTregs antígeno-específica fueron capaces de suprimir la enfermedad autoinmune mediada por Th17.	Huter <i>et al</i> , 2008 [190]
Células T vírgenes CD4+CD25- del bazo + perlas CD3/CD28 + TGF-β + IL-2 (5 días)	Ratón B6 sensibilizado con OVA vía i.p (día 1 y 14) y i.n. (día 25, 26 y 27)	Infusión previa o posterior del reto alérgico, de 5 x 10 ⁶ células Tregs inducidas (separadas) por vía i.v. (día 22 o 25)	iTregs transferidas antes y posterior al reto alérgico, reducen la inflamación alérgica en las vías respiratorias y mejor su función, de manera comparable cuando se transfiere las nTregs.	Xu <i>et al</i> , 2012 [194]
Células T vírgenes CD4+CD25- del bazo CII + APC + CII + IL-2 + TGF-β (4 días)	Ratón TCR CII con artritis inducido con colágeno (CII) + CFA (s.c)	Transferencia de 3 x 10 ⁶ células inducidas (i.v) (día 0, 14 o 28)	Reducción de inflamación articular, Ab anti-CII (mayor estabilidad en las inducidas cuando la enfermedad ya está establecida)	Kong <i>et al</i> , 2012 [191]
Células T CD4+CD25- del bazo + CD3/CD28 + IL-2 + TGF-β + ATRA (4 días)	Rata con trasplante traqueal alogénico	Transferencia de células inducidas (1 y 3 días después trasplante)	Reducción de síntomas de obliteración aérea, de células Th17 y Th1, y de la expresión de citocinas proinflamatorias en el injerto; que fue superior con la transferencia de iTregs inducidas con ATRA.	Shi <i>et al</i> , 2011 [195]
Células T “naïve” + BMDC + anti-IFNγ + anti-IL4 + IL-2 + TGF-β + ATRA (8-10 días)	Ratones con trasplante de corazón alogénico	Transferencia de 1x10 ⁶ células inducidas por vía directa o indirecta (1 día antes del trasplante)	Tregs inducidas por vía indirecta prolongan la supervivencia del injerto por más de 100 días, de manera similar a las nTregs.	Takasato <i>et al</i> , 2014 [196]
Células T vírgenes del bazo + perlas anti-CD3/CD28 + IL-2 + TGF-β (3 días)	Ratones con lupus eritomatoso sistémico establecido (modelo MZM2328)	Transferencia de células inducidas o naturales	Reducción superior de los niveles de auto-anticuerpos por parte de las Tregs inducidas. Las iTregs suprimen a las células B por señales dependientes del TGF-β.	Xu <i>et al</i> , 2016 [197]
Células T vírgenes del bazo + perlas anti-CD3/CD28 + IL-2 + TGF-β (3 días)	Ratones Balb/c presensibilizados (injerto de piel 4 días previos) que recibieron un trasplante renal de ratones C3H	Transferencia de 3 x 10 ⁶ células inducidas (i.v) (día -5, -4, 0 y 3 después del trasplante)	Reducción de los niveles circulante de anticuerpos antidonantes, su deposición y de la infiltración celular en el aloinjerto.	Tao Liao <i>et al</i> , 2017 [198]

Tabla 1. Estudios comparativos en modelos murinos sobre la eficiencia de las tTregs e iTregs en atenuar la enfermedad.

Uno de los principales obstáculos para el uso de las iTregs es su inestabilidad, por esta razón es necesario desarrollar estrategias para convertir células iTregs inestables en estables. Si bien la adición de rapamicina y ácido retinoico permiten una mayor conversión y estabilidad de Tregs a partir de células T “naïve”, estas no llegan a convertirse totalmente, teniendo una mezcla de células Treg y efectoras contaminantes. Trabajos recientes han reportado que la modificación epigenética puede ser la solución para obtener iTregs estables, se demostró que las proteínas TET2/3 median la desmetilación de la región CNS1/CNS2 en el gen FOXP3 y su actividad es potenciada por la vitamina C, el cual induce la desmetilación en la región CNS2 en una manera Tet2 dependiente [199, 200]. Ellos han demostrado que los motivos CpG del CNS2 en las células Tregs generadas *in vitro* por TGF- β , el cual originalmente se encuentra metilado, se llegan a desmetilar después del tratamiento con la vitamina C, sugiriendo que potenciando a las enzimas con pequeñas moléculas como la vitamina C se puede incrementar la eficacia de las iTregs para su aplicación clínica como es en el trasplante de órgano, aunque aún se requiere estudios posteriores que corroboren estos resultados además de evaluar su relativa aplicación clínica. Son pocos los protocolos publicados sobre generación *in vitro* de Tregs humanos, la mayoría de ellos policlonales y en cultivos de corto plazo (Tabla 2). Una futura terapia con iTregs requiere una alta producción, pureza y estabilidad, de manera de evitar la transferencia de células T convencionales contaminantes o la pérdida de fenotipo y función de aquellas ya transferidas, de manera que puedan provocar inflamación y autoinmunidad.

	Población celular puesta en cultivo	Estímulos empleados	Tiempo de cultivo/ Veces de expansión	Observaciones	Limitaciones	Referencias
Policlonales	CD4+CD25-CD45RA+ CD4+CD25-CD45RA-	Perlas anti-CD3/CD28 IL-2, TGF- β , \pm ATRA,	5 días de cultivo + 4-6 días de reposo	TGF- β más ATRA induce la expresión de FOXP3 en células T “naïve” , con potente función supresora. Las Tregs inducidas con TGF- β /ATRA mantienen la expresión de FOXP3 hasta 10 días después del reposo con solo IL-2. Las células T de memoria son resistentes a la inducción de FOXP3, e inhibe la conversión a Tregs de las células T “naïve” .	No hay datos sobre el patrón de desmetilación de la región CNS2 No hay datos sobre cultivos a largo plazo No hay datos sobre su estabilidad en condiciones proinflamatorias	Jun Wang <i>et al</i> , 2009 [201]
	CD4+CD25-CD45RA+	APC artificiales (K562) que expresan CD86 y tienen receptor de unión para anti-CD3, IL-2, TGF- β , \pm rapamicina	14 días de cultivo (re-estimulación en el día 7, adición de RAPA en el día 0 o 7) Se obtuvieron 240,000 x 10 ⁶ a partir de todas las CD4+CD25- presentes en una unidad de sangre	Las células iTregs inducidas con TGF- β y rapamicina, presentan una mayor expresión de FOXP3, además de ser anérgicas y secretar poca IL-2, IL17 e IFN γ , después de ser estimuladas con PMA/Ionomicina. TGF- β /Rapamicina induce similar expresión de FOXP3 y función supresora en células T “naïve” o no fraccionadas (“naïve” y de memoria).	No hay datos sobre el patrón de desmetilación de la región CNS2 No hay datos sobre su estabilidad en condiciones proinflamatorias	K.L. Hippen <i>et al</i> , 2011 [202]
	CD4+CD45RA+CD25-CD127hi	<ul style="list-style-type: none"> Anti-CD3 (OKT3), anti-CD28 soluble, IL-2, TGF-β, \pmIL10. Monocitos CD14+ estimulados con LPS, anti-CD3, IL-2, TGF-β, \pmIL10. 	5 días de estimulación + dos días de reposo	IL-10 aumenta la expresión de FOXP3, CTLA-4 y la función supresora en Tregs inducidas con TGF-B, pero sin cambios en el estado de desmetilación de FOXP3. IL10 contribuiría en la activación de STAT3, inhibición de la vía PI3K/AKT y localización nuclear de Foxo1.	Gen FOXP3 se mantiene metilado. No hay datos sobre cultivos a largo plazo	Peter hsu <i>et al</i> , 2015 [203]
	CD4+CD45RA+CD25-	Anti-CD3 (OKT3), anti-CD28 soluble, IL-2, TGF- β , \pm rapamicina, \pm ATRA, \pm Butirato	6 -13 días de cultivo (1 o dos ciclos de estimulación + reposo)	TGF- β más ATRA y Rapa resultó ser la mejor combinación para la inducción de Tregs con una superior función supresora <i>in vitro</i> . Cuando son puestas en reposo, se requiere de IL-2 para mantener la expresión de FOXP3, la adición de TGF- β y los otros aditivos aumenta su estabilidad, la re-estimulación provoca la pérdida de FOXP3.	Las iTregs generadas no retienen la expresión de FOXP3, dado que no suprimen <i>in vivo</i> en un modelo murino de injerto contra huésped. La región TSDR de gen FOXP3 se mantiene metilada.	Angelika Schmidt <i>et al</i> , 2016 [204]

	CD4+CD45RA+ CCR7+	Perlas anti-CD3/CD28 IL-2, TGF- β , ATRA, \pm Vitamina C	6-12 días de cultivo (1 o dos ciclos de estimulación + reposo)	Vitamina C potencia la pérdida de 5mC de la región CNS2 del gen FOXP3 y aumenta la estabilidad y función supresora de las células iTregs.	No hay datos sobre cultivos a largo plazo No hay datos sobre su estabilidad en condiciones proinflamatorias No hay datos sobre el patrón de desmetilación de la región CNS2.	Xiaoqing Yue <i>et al</i> , 2016 [199]
	CD4+CD45RA+	Perlas anti-CD3/CD28 IL-2, TGF- β , \pm ATRA, \pm rapamicina	5 días de cultivo	ATRA incrementa la generación de Tregs inducidas con TGF- β /IL-2, pero la adición de rapamicina no aumenta esta frecuencia. Las Tregs generadas con ATRA tienen una mayor expresión de la integrina β 7 y las generadas con RAPA expresan en su mayoría CXCR4. Ni ATRA y RAPA tienen efecto sobre la región CNS2, que se mantiene metilada.	No hay datos sobre cultivos a largo plazo No hay datos sobre su estabilidad en condiciones proinflamatorias.	Enzo Candia <i>et al</i> , 2017 [205]
	CD4+CD25-	<ul style="list-style-type: none"> DC alogénica, antígeno del virus de influenza HA, PBMC CD4- irradiadas DC autólogos, antígeno HA 	10 días de cultivo	Se lograron generar células CD4+CD25+ específicas para HA y con supresión dependiente de contacto. Con el uso de tetrámeros HLA-II se lograron aislar las células Tregs generadas específicas para HA.	No hay datos sobre cultivos a largo plazo No se evaluó el patrón de desmetilación de la región CNS2. No hay datos sobre su estabilidad en condiciones proinflamatorias.	Mindi R. Walker <i>et al</i> , 2005 [206]
Alo-específicas	CD4+CD45RA+CD45RO- CD25-	Células B alogénicas transfectadas con CD40-L \pm IL-2	7-21 días de cultivo (células CD40L fueron añadidas cada 7 días). Se obtuvieron hasta 8,3 x10 ⁶ por cada millón de "naïve", en 21 días de cultivo.	Se generaron unas células CD4 ^{high} CD25 ⁺ , que expresan FOXP3 y son CD62L+CCR7- además de expresar CTL4 y GITR. Estas células suprimen por contacto y pueden ser continuamente expandidas mediante adición semanal de células B-CD40L, sin perder su función y enriqueciéndose la población, consiguiéndose un 92% a las tres semanas de expansión.	No se evaluó el patrón de desmetilación de la región CNS2	Wenwei Tu <i>et al</i> , 2008 [207]
	CD4+CD25- CD127+CD45RAhiCCR7hi	Células dendríticas derivadas de monocitos IL-2, TGF- β , ATRA, \pm Vitamina C	7 días de inducción (cocultivo)	En comparación a los cocultivos sin vitamina C, la fracción celular CD4+CD25+ de los cocultivos con vitamina C son 40% FOXP3 ^{hi} , cuya expresión es más estable cuando las células son cultivadas por 7 días adicionales con solo IL-6. La región TSDR del gen FOXP3 de esta fracción celular presenta indicios de desmetilación, en comparación a los cocultivos sin Vitamina C.	No hay datos sobre cultivos a largo plazo No se aisló la fracción enriquecida en FOXP3 para evaluar la desmetilación de la región TSDR.	Hidenori Kasahara <i>et al</i> , 2017 [208]

Tabla 2. Protocolos reportados de generación de células T reguladoras humanas

9. ENSAYOS CLÍNICOS

Un factor a considerar sobre los protocolos desarrollados para la utilización clínica de Tregs en la inducción trasplante, es que ellos deben ser realizados dentro de las normas de “Buenas prácticas de manufactura” (GMP), para garantizar su efectividad, calidad y seguridad. Entre las estrategias para aislar las células Tregs está el empleo del sistema CliniMACS, que actualmente es la única tecnología compatible con GMP, sin embargo aislar células en base a la expresión de CD25 puede incluir células T convencionales contaminantes, que pueden ser distinguidos si se aíslan las células CD25^{HI}, que solo puede lograrse mediante Citometría de flujo.

Hasta la fecha, los ensayos clínicos donde emplean Tregs en terapia celular corroboran la seguridad y eficacia de las células T reguladoras aisladas y expandidas. En todos los ensayos se utilizaron células Tregs procedentes de periferia o cordón umbilical del donante (trasplante de médula ósea) o receptor (diabetes mellitus tipo 1) que fueron aisladas por FACS (Fluorescence activated cells sorting) o columnas MACS (Magnetic activated cells sorting). Estas células se infundieron directamente [209] o expandieron policlonalmente mediante perlas anti-CD3/CD28 e IL-2 previo a su infusión, en una dosis que va de 1×10^5 – 30×10^6 Tregs por kilogramo del paciente; reportándose el retiro exitoso de los inmunosupresores [210], disminución en la incidencia de GVHD agudo [211] y reconstitución inmune acelerada [209] en pacientes con trasplante de médula ósea; o menor requerimiento de insulina externo que incluso llevó a su retiro exitoso en niños con Diabetes mellitus tipo 1 [212]. En cuanto a trasplante de órganos sólidos, los ensayos clínicos existentes aún están en desarrollo, como ONE study (NCT02129881) y ThRIL (NCT02166177) que pretende expandir

policlonalmente células Tregs autólogas para su infusión en pacientes con trasplante renal o hepático, respectivamente. Un primer reporte del ensayo clínico ThRIL ha definido el protocolo usado para la expansión ex vivo de Tregs desde una perspectiva de trasplante hepático. Ellos reportaron el enriquecimiento de una población estable de Tregs (>95% CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺), alcanzando los números adecuados para su aplicación clínica, además mencionaron que los primeros dos pacientes reclutados ya recibieron la infusión de Tregs y no reportaron toxicidad hasta la fecha [213]. Estos ensayos permitirán conocer sobre la seguridad y efectividad de la terapia con Tregs; es necesario diseñar otros protocolos que evalúen el efecto de los regímenes inmunosupresores sobre las Tregs infundidas, así como determinar la dosis y el número de infusiones de Tregs en los pacientes trasplantados y comparar su eficacia con el empleo de Tregs antígeno-específicas, que de acuerdo a estudios previos en modelos murinos serían más efectivas que las policlonales en la inducción de tolerancia, ya que se requerirían menores números. Sin embargo, en un escenario de autoinmunidad o trasplante de órgano, muchos auto o aloantígenos estarían desencadenando la auto o alorrespuesta respectivamente, por lo que no se debe descartar la efectividad del empleo de células T reguladoras expandidas/generadas policlonalmente.

Un problema real en la terapia clínica con las células T reguladoras, es la posibilidad que las células inyectadas puedan adquirir un fenotipo inflamatorio. Se ha descrito que la rapamicina es esencial en la producción de una población estable de Tregs debido a la inhibición de la producción de IL-17 e IFN- γ *in vitro* [214], por lo que su administración en el momento de la infusión de las Tregs podría promover su supervivencia y estabilidad. Así, la terapia adoptiva con Tregs, debe también incluir las condiciones favorables que favorezca la “implantación” celular y de ese modo la posibilidad de inducir tolerancia (Figura 6).

Terapia con células T reguladoras aloespecíficas

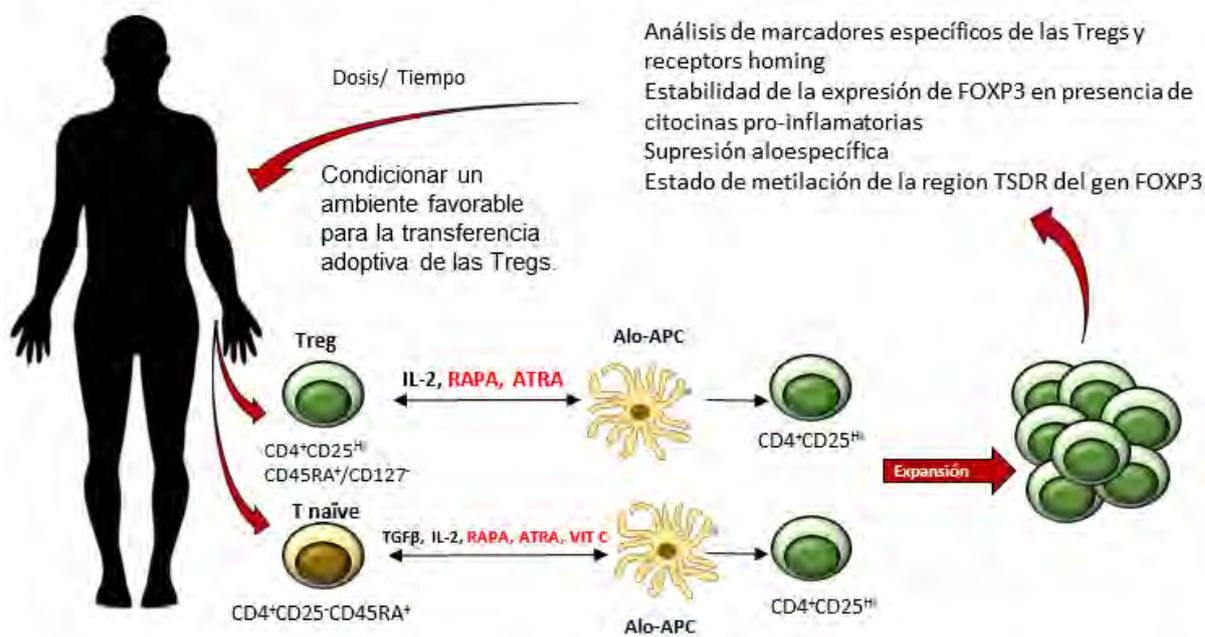


Figura 6. Uso de Tregs aloespecífica para la inducción de tolerancia al trasplante. La expansión/generación de Tregs aloespecífica requiere un estímulo antígeno-específico y señales de coestimulación. Además, para promover su estabilidad y función supresora por largo plazo, es necesario incluir otros mediadores como rapamicina, ácido retinoico o vitamina C (letras rojas). Previo a la infusión adoptiva, las Tregs expandidas/generadas necesitan ser evaluadas en su fenotipo, función y estabilidad en presencia de citocinas proinflamatorias (ejemplo: IL-6, TNF- α e IFN γ) y epigenética. Además previo a su infusión, se debe condicionar un ambiente en el receptor que sea favorable para su mantenimiento y estabilidad *in vivo*.

Otra consideración para el uso de Tregs como terapia adoptiva es que ellos puedan migrar hacia el órgano o células blanco para realizar sus efectos regulatorios. Se han descrito varias quimiocinas y sus receptores que regulan la migración de las Tregs. Se reportó CXCR3 y CCR5 como marcadores para células T asociados con ciertas reacciones inflamatorias [215]. En efecto, en estudios que evalúan la coexpresión de CCR5 o CXCR3 en células T $CD25^+FOXP3^+$ humanas se ha descrito una correlación

positiva con la función renal del aloinjerto en pacientes que reciben tacrolimus [216]. Además que la transferencia adoptiva de células Tregs CXCR3⁺ expandidas *ex vivo* en ratones con hepatitis autoinmune eficientemente se dirigió al órgano inflamado, induciendo una remisión de la enfermedad [217]. Estos datos podrían sugerir que la transferencia de Tregs con alta expresión en su superficie de CXCR3 podría potenciar su migración a los sitios de inflamación como es en un escenario de trasplante de órganos de manera que controle efectivamente a las células T alorreactivas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar del papel crucial de las células T reguladoras en el mantenimiento de la tolerancia al órgano injertado, se desconoce el impacto de las drogas inmunosupresoras Ciclosporina A y Belatacept sobre el fenotipo y función de las células T reguladoras en pacientes trasplantados estables, sujetos a un tratamiento prolongado de inmunosupresor.

Las células T reguladoras no sólo contribuirían al mantenimiento de la tolerancia, sino que también funcionarían limitando la respuesta alorreactiva. Debido a que las Treg podrían encontrarse en un ambiente inflamatorio a lo largo de la vida del individuo trasplantado, es fundamental asegurar la estabilidad de la Treg infundidas, para evitar que estas células se puedan convertir en células inflamatorias que podrían causar daño al injerto y al paciente. En este sentido aún no se ha obtenido la metodología idónea que permitiría la generación y expansión de células T reguladoras aloespecíficas a partir de células T “naïve” con capacidad supresora estable, y en un número adecuado para ser aplicadas en la terapia clínica.

HIPÓTESIS

La función supresora de las células T reguladoras provenientes de pacientes trasplantados bajo tratamiento con Belatacept será superior a los individuos tratados con Ciclosporina A.

Es posible generar células T reguladoras inducidas (iTregs) *in vitro* a partir de la conversión de células T vírgenes estimuladas con antígenos de donadores, que puedan ser expandidas y mantengan su fenotipo y función supresora en condiciones inflamatorias.

JUSTIFICACIÓN

Existen muchas evidencias en animales y humanos que resaltan el papel de las células T reguladoras en la inducción de tolerancia al trasplante y dado que en ese escenario es imprescindible la administración de inmunosupresores para evitar el problema del rechazo de injerto, no es posible evitar la convivencia de las drogas con las células T reguladoras. Por eso, evaluar el impacto de los inmunosupresores como el inhibidor de la calcineurina (Ciclosporina A) y de la coestimulación (Belatacept) sobre las Tregs nos permitirá conocer sobre el efecto de la drogas en la inducción de tolerancia al trasplante mediado por las Tregs, así como tomar decisiones sobre la optimización de las técnicas de expansión y generación de Tregs, así como la toma de decisiones en la clínica sobre el manejo adecuado de drogas que permitan el mantenimiento y función de las Tregs.

Si bien existen en la fecha muchos avances en el desarrollo de metodologías para el empleo de Tregs en la terapia celular, la mayoría de ellas están condicionadas a su expansión a partir de Tregs pre-existentes. Sin embargo, evidencias recientes señalan la superioridad de las iTregs inducidas *in vitro* en condiciones inflamatorias como ocurriría en un escenario de trasplante, y dado al número mayor de células T “naïve” en periferia a partir de las cuales se pueden convertir Tregs *de novo*, es importante desarrollar un metodología idónea para la generación de iTregs con fenotipo y función supresora estable, específica para el antígeno del donante y en un número adecuado para su infusión que pueda ser utilizada en la terapia clínica.

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el impacto de las drogas inmunosupresoras sobre el fenotipo y función de las células T reguladoras en pacientes trasplantados y establecer un protocolo para la generación iTregs aloespecíficas con función supresora estable.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterización fenotípica y funcional de las células T reguladoras de pacientes trasplantados bajo tratamiento con Belatacept y Ciclosporina

- ✓ Evaluación del número y porcentaje de Tregs naturales e inducidas en pacientes trasplantados e individuos sanos.
- ✓ Análisis fenotípico de las Tregs de sangre periférica mediante empleo de marcadores característicos (CD4, CD25, CD127, FOXP3).
- ✓ Análisis funcional de las Tregs mediante ensayos de supresión autóloga.
- ✓ Cuantificación de citocinas de sobrenadantes de los ensayos de supresión.
- ✓ Análisis de metilación de la región TSDR del gen FOXP3 de las Tregs.

2. Generación y expansión de células T reguladoras aloespecíficas inducidas con capacidad supresora estable a partir de células T vírgenes de individuos sanos

- ✓ Generación aloespecífica de iTregs utilizando células dendríticas derivadas de monocitos alogénicos.
- ✓ Expansión policlonal (perlas anti-CD3/CD28) de las iTregs aloespecíficas generadas.
- ✓ Evaluación de la estabilidad frente a citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α .
- ✓ Evaluación de la función supresora aloespecífica de las iTregs generadas.
- ✓ Cuantificación de citocinas de sobrenadantes producidas en los ensayos de supresión.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Caracterización de las células T reguladoras de pacientes trasplantados bajo tratamiento con Belatacept y Ciclosporina A

1.1 Grupos de estudio

1.1.1 Pacientes con trasplante renal

Se incluyeron 35 pacientes adultos que recibieron un trasplante renal de donante vivo o cadavérico (24 con Belatacept y 11 con Ciclosporina) quienes anteriormente participaron en el ensayo clínico BENEFIT (estudio IM103008). BENEFIT es un estudio multicéntrico, fase III, randomizado, en el que se evaluó la eficacia y seguridad de la inmunosupresión basada en Belatacept en comparación con la inmunosupresión basada en Ciclosporina A como principal inmunosupresión de mantenimiento. Todos los pacientes recibieron Basiliximab como terapia de inducción y Micofenolato de mofetilo y Prednisona como terapia de mantenimiento adjunto. Belatacept (BLT) fue administrado en la dosis de 5 mg/kg cada 4 semanas, y Ciclosporina A (CsA) en una dosis adecuada de manera que mantenga la droga en unos niveles sanguíneos de 100-200 ng/dl. La dosis diaria de Micofenolato de mofetilo y Prednisona en ambos grupos fue de 1g y 5 mg por día, respectivamente. La exposición diaria a Micofenolato de mofetilo y Prednisona fue comparable en ambos grupos.

Este estudio fue realizado con autorización de la compañía farmacéutica Bristol-Myers Squibb (protocolo IM103-351) y aprobado por el Comité de ética en investigación del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM), el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (número de referencia 1535), el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez y el Instituto Mexicano de Trasplantes, y realizado de acuerdo a la Declaración de Helsinki, Declaración de

Estambul y la Guía de buenas prácticas clínicas. Todos los pacientes que participaron en este estudio de investigación firmaron previamente un consentimiento informado. Todos los pacientes tienen un promedio de 7 años de estar trasplantado, presentan una función renal estable y con no evidencia clínica/bioquímica de rechazo.

1.1.2 Individuos sanos

Los individuos sanos consistieron de donantes voluntarios del banco de sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, y formaron parte de nuestro grupo control. Las muestras fueron obtenidas a partir del paquete leucocitario proporcionado por el banco de sangre.

1.2 Caracterización fenotípica por Citometría de Flujo

Se obtuvo sangre periférica de los pacientes trasplantados o individuos sanos. Las muestras sanguíneas se pasaron por un gradiente de Ficoll-PaqueTM Plus (GE Healthcare) para el aislamiento de las células mononucleares (CMSP). Después de sus respectivos lavados, las CMSP fueron marcadas con los anticuerpos mononucleares anti-CD4 FITC, anti-CD127 PE-CY7, anti-CD25 PE-CY5 y anti-CD45RA APC-H7 (BD Biosciences) e incubados en oscuridad por 20 min a 4°C. Para la tinción intracelular, las células fueron lavadas y permeabilizadas con la solución de fijación/permeabilización (Tonbo Biosciences) e incubadas por 12 hr a 4°C. Al cabo de la incubación, las células fueron lavadas con el buffer de permeabilización 1X e incubadas por 30 min, a 4°C con los anticuerpos anti-FOXP3 AlexaFluor647 (Beckman Coulter) y anti-Helios PE. Después de sus respectivos lavados, las células fueron adquiridas con el citómetro de flujo Attune® NxT (Life Technologies) y se adquirieron un total de 100,000 eventos para el análisis. Los datos fueron analizados con el software FlowJo 7.6.2 (Tree Star,

Ashland, OR) y se estableció la estrategia de análisis de regiones para la identificación de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T (Figura 7).

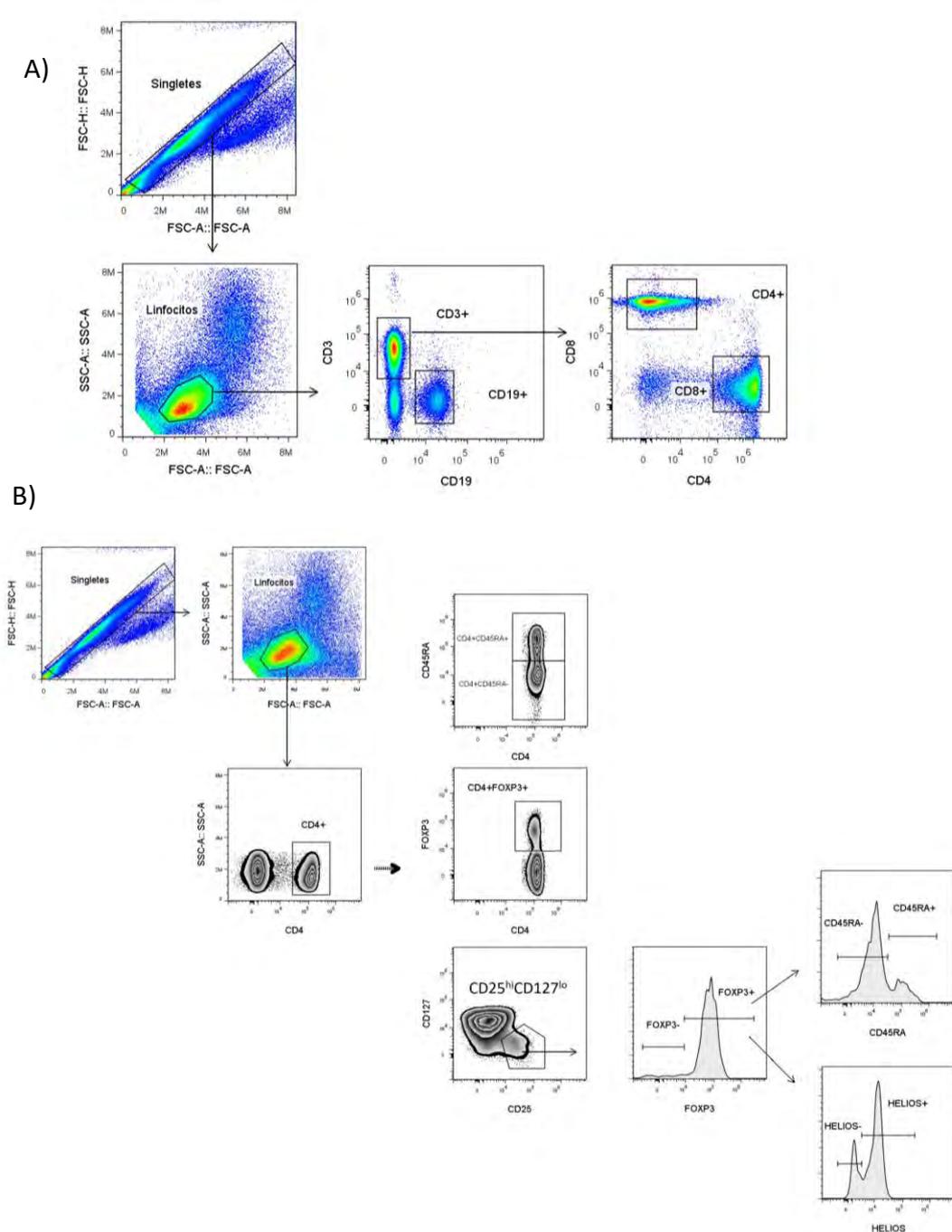


Figura 7. Estrategia de análisis para la identificación de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T. A) Primero se definieron los singlets a través del dotplot FCS-H vs FCS-A, y a partir de esta región se seleccionaron los linfocitos para la identificación de las subpoblaciones de linfocitos T CD3⁺ y CD19⁺ (A), además de las células T CD4⁺ (B) y dentro de ellas a las “naïve”, FOXP3⁺ y CD25^{hi} CD127^{low}. La región CD25^{hi} CD127^{low}, incluye más del 90% de linfocitos T Foxp3⁺ como indica el histograma y dentro de ellas se analizó el porcentaje de Tregs “naïve” (CD45RA) y las Treg Helios⁺ (de origen tímico) o Helios⁻ (periféricas).

1.3 Ensayo de supresión de células T

El ensayo de supresión se realizó mediante cocultivos entre las células CD4⁺CD25^{hi} y células T CD3⁺ aisladas de las CMSP de los pacientes o individuos sanos. Para ello, 50 x 10⁶ CMSP fueron marcadas con anti-CD4 PE and anti-CD25 PECY5 e incubadas por 20 min a 4°C. Al cabo del tiempo se lavaron, resuspendieron en PBS 1X y separaron las células CD4⁺CD25^{hi} (células T reguladoras) mediante el sorter FACs Aria I (BD Biosciences) (Figura 8A). Las células separadas se colectaron en medio RPMI/20% FBS, lavadas una vez y resuspendidas en el medio de cultivo utilizado en el ensayo de supresión. Para ello, previamente se aislaron células T CD3⁺ mediante selección negativa mediante el Kit de aislamiento Pan T cell (Miltenyi Biotec, San Diego, CA) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Las células T CD3⁺ aisladas fueron marcadas con 2.5 µM de CFSE a 37 °C por 15 min y lavadas 3 veces con el medio de cultivo RPMI 10% FBS. Para el ensayo de supresión, 50 x 10³ células T CD3⁺ (células T respondedoras) marcadas con CFSE fueron cocultivadas con las células T reguladoras separadas del mismo individuo, en diferentes proporciones de Tregs: Tresp (0:1, 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16) en medio RPMI suplementado con 10% suero humano AB y en presencia de las perlas de activación anti-CD3/CD28 Human Treg Suppression Inspector (Miltenyi Biotec) en una proporción de 1 perla por cada célula T respondedora. Después de 5 días de cocultivo, las células fueron teñidas con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8, y adquiridas con el citómetro de flujo Attune® Acoustic. Los datos fueron analizados con el software FlowJo 7.6.2 (Tree Star, Ashland, OR). El porcentaje de proliferación de las células T respondedoras en presencia y ausencia de células T reguladoras, fue determinado mediante la dilución del marcador celular CFSE (Figura 8 B). La supresión fue calculada como inhibición relativa usando la siguiente

fórmula: $[(\% \text{Proliferación de Tresp en ausencia de Tregs} - \% \text{Proliferación de Tresp en presencia de Tregs}) / \% \text{Proliferación de Tresp en ausencia de Tregs}] \times 100$.

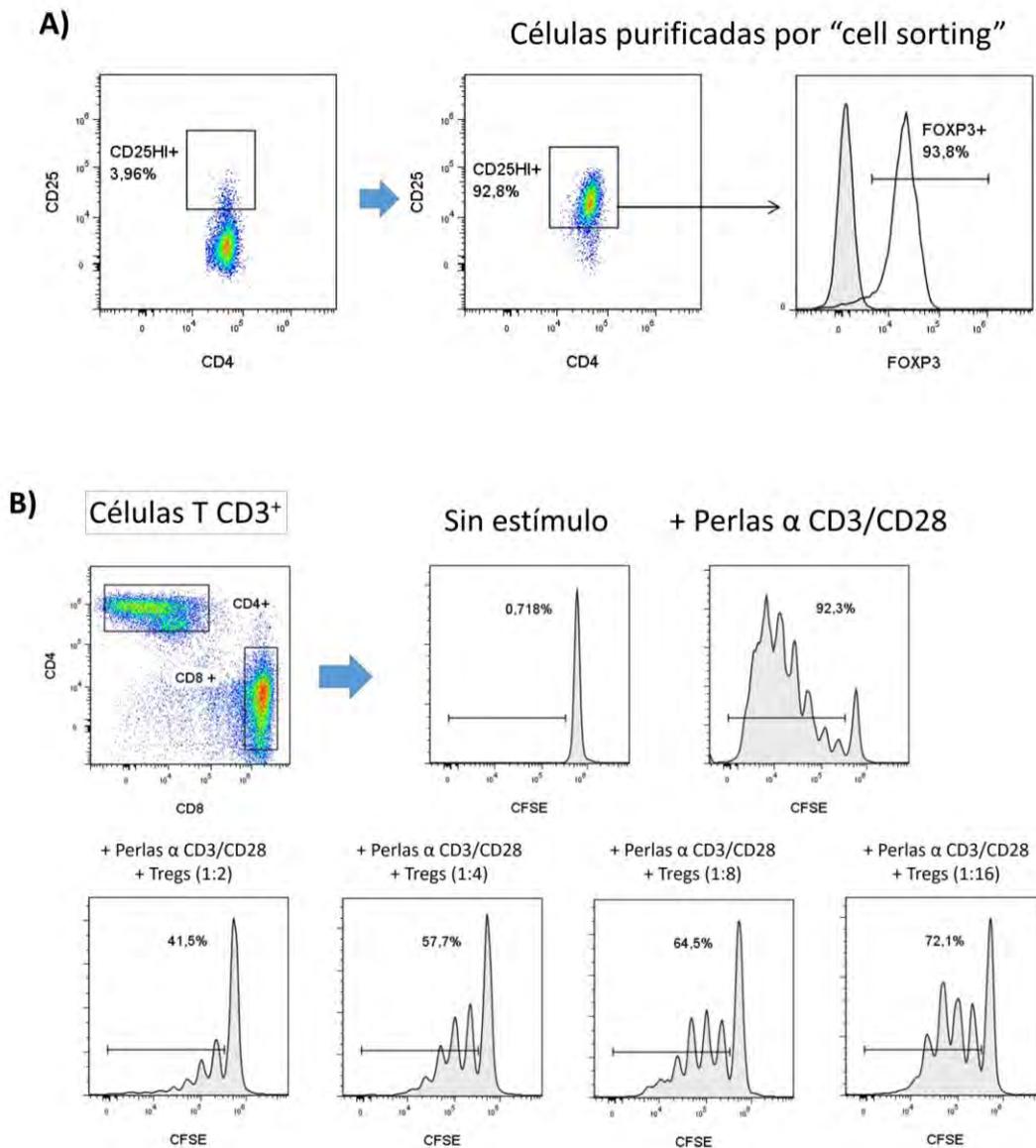


Figura 8. Estrategia de aislamiento de células Tregs para ser utilizadas en los cultivos de ensayo de supresión. Se aislaron las células CD4⁺CD25^{hi} de los individuos en estudio, se procuró que las células Tregs empleadas sean en su mayoría FOXP3⁺ (histograma) (A). La supresión fue calculada como inhibición relativa, teniendo en cuenta el porcentaje de proliferación de las células T respondedoras (T CD3⁺) en ausencia y presencia de diferentes proporciones de células Tregs, determinado mediante la dilución del marcador celular CFSE (B).

1.4 Ensayo de producción de citocinas

Se midieron los niveles de las citocinas IL-2 e IFN- γ en los sobrenadantes de los cocultivos provenientes de los ensayos de supresión, mediante el Kit de inmunoensayo basado en perlas (CBA “cytokine bead array”) LEGENDplex (Biolegend) siguiendo las instrucciones del proveedor. El inmunoensayo LEGENDplex sigue el mismo principio básico de un inmunoensayo tipo sándwich, y la detección de las citocinas es mediante perlas al cual están conjugadas anticuerpos específicos para una citocina en particular (perla de captura). Cada perla de captura difiere en tamaño y niveles de expresión del fluorocromo APC, que permite distinguir claramente un perla de captura de la otra. Brevemente, los sobrenadantes fueron incubados con un panel de perlas de captura, luego mezclados con anticuerpos biotinilados de detección y subsecuentemente con estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE), proveyendo señales fluorescentes con intensidades en proporción a la concentración de citocina presente en el sobrenadante, que fueron cuantificadas mediante el citómetro de flujo Attune® NxT (Life Technologies). La concentración de las citocinas en los sobrenadantes fue determinada mediante una curva estándar generada en el mismo ensayo. Los experimentos fueron realizados en cuadruplicados y repetidos dos veces. Se consideraron las condiciones: 1) solo células T respondedoras activadas por 5 días con perlas anti-CD3/CD28 y 2) cocultivo de células T respondedoras activadas con las perlas y en presencia de Tregs autólogas en una proporción 2:1.

1.5 Análisis del patrón de metilación de la región TSDR del gen FOXP3 de las células T reguladoras

Se evaluó el patrón de metilación de la región de desmetilación específica de las Tregs (TSDR “Treg specific demethylation region”) del gen FOXP3 en las células

CD4⁺CD25^{hi} aisladas de los pacientes trasplantados e individuos sanos. Como control negativo de desmetilación se consideraron las células T CD4⁺CD25⁻CD45RA⁺. Se utilizó el Kit EZ DNA Methylation-Direct (Zymo Research Corp, USA) para extraer el ADN de las células separadas y tratarlo con Bisulfito de Sodio, siguiendo las indicaciones del inserto. El ADN tratado con Bisulfito se sometió a una amplificación de la región TSDR del gen FOXP3 mediante PCR, usando los primers: 5'TGTTTGGGGGTAGAGGATTT-3' and o-5'TATCACCCACCTAAACCAA-3'. Se purificó el producto de ADN amplificado del gel mediante el kit QIAEX II gel extraction (Qiagen, Germany). El producto purificado se sometió a ligación en el vector pGEM-T Easy System 1 para luego proceder a transformar las bacterias DH5 α mediante choque térmico, para la clonación del producto purificado. Las clonas bacterianas recombinantes fueron identificadas mediante el sistema azul/blanco. Se seleccionaron las clonas blancas que son las que contienen el vector recombinante y se procedió a aislar los plásmidos utilizando el Kit FavorPrep Plasmid Extraction. La presencia del producto en los plásmidos fue verificado mediante digestión con la enzima EcoRI. Los plásmidos que dieron positivos para el producto fueron secuenciados mediante el Analizador Genético 3500 (Applied Biosystems, USA). Se consideraron 10 clonas por muestra. Las secuencias fueron analizadas mediante el software Bioedit 7.2.5 (Ibis Biosciences, USA).

1.6 Reacción mixta de linfocitos

Para evaluar la presencia de linfocitos T alorreactivos en los pacientes bajo estudio, se realizaron cocultivos alogénicos entre las células T CD3⁺ del receptor con las CMSP irradiados de su respectivo donante. Para ello, se aislaron células T CD3⁺ de los receptores e individuos sanos mediante selección negativa usando el Kit de aislamiento Pan T cell (Miltenyi Biotec, San Diego, CA) de acuerdo a las instrucciones del

proveedor. Las células T CD3⁺ aisladas fueron marcadas con 2.5 μ M de CFSE a 37 °C por 15 min y lavadas 3 veces con el medio de cultivo RPMI 10% FBS. En paralelo, se aislaron las CMSP de sus donantes e individuos sanos, que fueron lavadas e irradiadas a 3000 rads. Para el ensayo, 50 x 10³ células T CD3⁺ (células T respondedoras) marcadas con CFSE de los receptores fueron cocultivadas con las CMSP irradiadas de su respectivo donante, en la proporción de 1:2, en medio de cultivo OpTmizer™ CTS™ T-Cell Expansion (Gibco) y con 20 U/ml de IL-2. Se consideró como control, otro cocultivo con un individuo que no fue su donante (control no relacionado), además de cocultivos alogénicos entre TCD3⁺ y CMSP irrd de individuos sanos. Después de 5 días de cocultivo, las células fueron teñidas con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8, y adquiridas con el citómetro de flujo Attune® Acoustic. Los datos fueron analizados con el software FlowJo 7.6.2 (Tree Star, Ashland, OR). El porcentaje de proliferación de las células T respondedoras fue determinado mediante la dilución del marcador celular CFSE.

2. Generación y expansión de células T reguladoras aloespecíficas inducidas con capacidad supresora estable

2.1 Generación y expansión de células T reguladoras policlonales

Una de las metodologías más desarrolladas en la obtención de Tregs inducidas es el empleo de perlas anti-CD3/CD28 y TGF- β para su generación; debido a que no son específicas para un antígeno son llamadas “policlonales”. Como ensayo previo a la obtención de iTregs aloespecíficas, se estandarizó la metodología para la generación y expansión de iTregs policlonales. Para ello, se aislaron células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos mediante una gradiente de Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare). 50 x 10⁶ de CMSP fueron incubadas con los anticuerpos anti-CD4, anti-CD25 y anti-CD45RA durante 20 min a 4°C. Al cabo del tiempo, las células se lavaron,

resuspendieron en PBS 1X y se adquirieron en el citómetro-sorter FACs Aria I (BD Biosciences) con el fin de separar por “sorting” las células CD4⁺CD25⁻CD45RA⁺ (Células T “naïve”). Las células separadas fueron recolectadas en medio RPMI/20% FBS, lavadas dos veces y resuspendidas en el medio de cultivo OpTmizer™ CTS™ T-Cell Expansion (Gibco) con 50 U/ml de IL-2 y como estímulo se utilizaron anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas a la concentración de 1 perla: 10 células en presencia de TGF-β-1 humano (10ng/ml), rapamicina (100 ng/ml) y/o ácido retinoico (10nM); el medio de cultivo fue refrescado con IL-2 y TGF-β-1 en el día 5. En el día 7 de cultivo, las células se lavaron y dejaron por 4 días con solo 50 U/ml de IL-2 (“reposo”). Después de los 4 días, las células se incubaron con los anticuerpos anti-CD4 y anti-CD25 durante 20 min, con el fin de separar las células CD4⁺CD25^{hi}. Las células separadas se lavaron y resuspendieron en el medio de cultivo OpTmizer y se expandieron con perlas anti CD3/CD28 (1:10), 5 ng/ml TGF-β1, 100 U/ml IL-2, 100 ng/ml Rapa y/o 10 nM ATRA por 4 días (expansión), para luego retirar los estímulos y dejarlas con sólo IL-2 por tres días (“reposo”). Este esquema se repitió hasta el día 21 y cada 7 días (4 expansión y 3 de “reposo”) se realizó un fenotipo y recuento.

2.2 Derivación de células dendríticas a partir de monocitos

Las células dendríticas se derivaron a partir de monocitos CD14⁺ aislados de paquetes leucocitarios, provenientes de donantes sanos voluntarios del banco de sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Para ello, se obtuvieron las células mononucleares a partir de las muestras sanguíneas mediante una gradiente de Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare). Una parte de las CMSP se resuspendieron en Suero Bovino Fetal 10% DMSO y se congelaron inmediatamente a -70°C y luego de 24 hr se guardaron en nitrógeno líquido, para ser utilizados en los cocultivos de inducción y ensayos de supresión posteriores. Las CMSP restantes se lavaron con Buffer MACS y

se incubaron con perlas anti-CD14 (Miltenyi Biotec) por 20 min a 4°C, al cabo del tiempo se lavaron y resuspendieron en Buffer MACS para la posterior separación magnética de las células CD14⁺ mediante columnas MACS. Las células CD14⁺, que fueron obtenidas mediante selección positiva, se lavaron dos veces con el Buffer MACS y al final con el medio de cultivo RPMI sin rojo fenol suplementado con 10% Suero humano. Se sembraron de 1-2 x 10⁶ células CD14⁺ en placas de 48 pocillos al cual se añadió 150 ng/ml de GM-CSF y 450 ng/ml de IL-4 en un volumen final de 500 µl de medio de cultivo. Las células fueron re-estimuladas con las citocinas cada 3 días durante 10 días que duró el cultivo. Al final del cultivo, las células fueron lavadas e irradiadas a 3000 rads antes de ser utilizadas en los cocultivos alogénicos. Se consideró una alícuota celular para evaluar su fenotipo mediante tinción con los anticuerpos anti-CD14, anti-CD11c, anti-CD86 y anti-HLADR.

2.3 Cocultivo alogénico entre células T “naïve” y células dendríticas derivadas de monocitos.

Se obtuvieron las células mononucleares a partir de muestras sanguíneas de otros donantes voluntarios sanos mediante una gradiente de Ficoll-PaqueTM Plus (GE Healthcare). 50 x 10⁶ de CMSP fueron incubadas con los anticuerpos anti-CD4, anti-CD25 y anti-CD45RA durante 20 min a 4°C. Al cabo del tiempo, las células se lavaron, resuspendieron en PBS 1X y se adquirieron en el sorter FACs Aria I (BD Biosciences) con el fin de aislar las células CD4⁺CD25⁻CD45RA⁺ (Células T “naïve”). Las células separadas se colectaron en medio RPMI/20% FBS, lavadas dos veces y resuspendidas en PBS 1X para su tinción con el marcador de proliferación celular CFSE. Después de la incubación con el marcador y lavados correspondientes, las células T “naïve” se resuspendieron en el medio de cultivo OpTmizerTM CTSTM T-Cell Expansion (Gibco) y se cocultivaron con las células dendríticas irradiadas derivadas de monocitos (como se

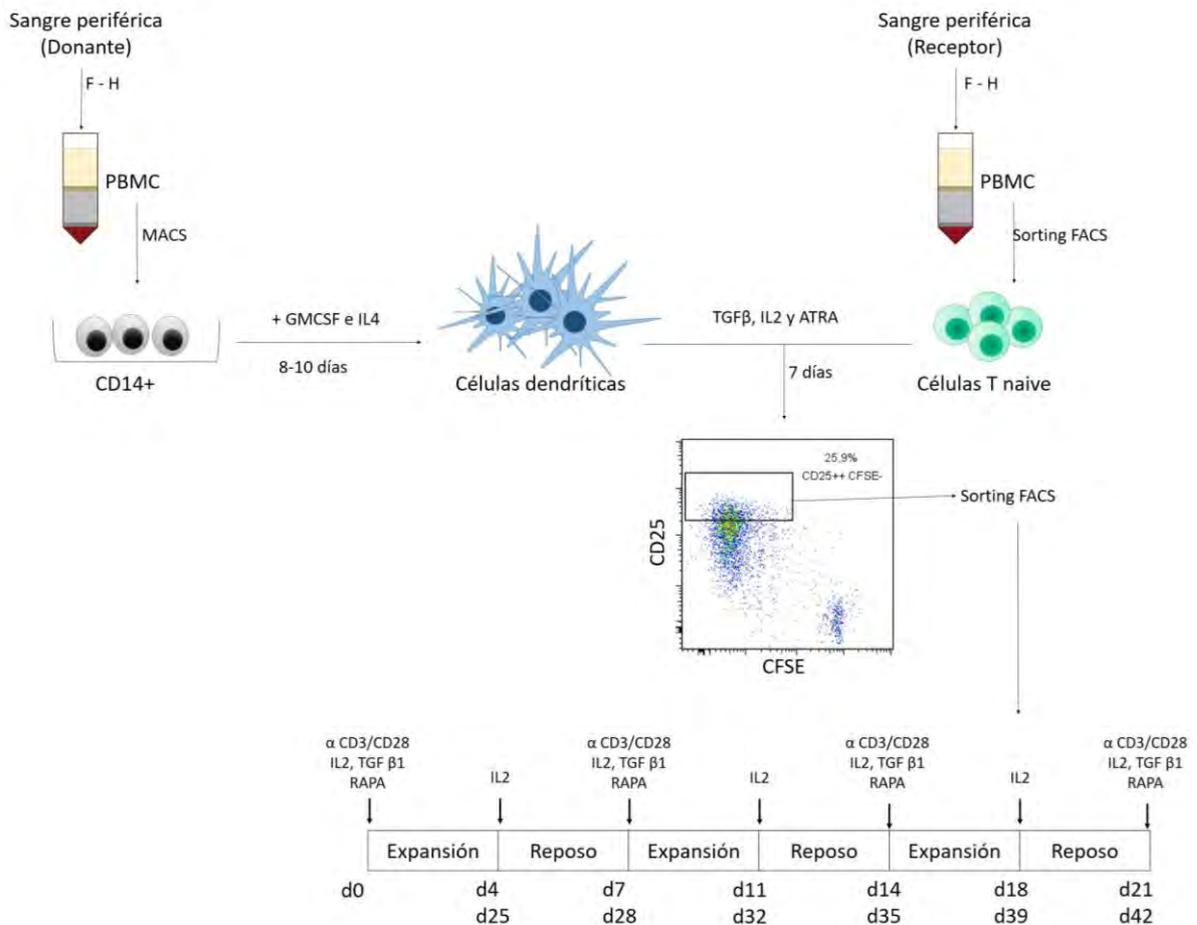
describe en el apartado 2.1) en una proporción de 1 dendrítica por cada 10 células T “naïve” y en presencia de 5ng/ml de TGF- β 1, 100 U/ml de IL-2 y 10 nM ATRA en placas de 96 pocillos, fondo U y durante 7 días. Ambas fuentes celulares provenían de diferentes donantes voluntarios (cocultivo alogénico).

2.4 Expansión de células T reguladoras inducidas aloespecíficamente

Al cabo de los 7 días, se aislaron las células proliferantes CD4⁺CD25^{hi} de los cocultivos entre células T “naïve” y dendríticas. Para ello, las células presentes en los cocultivos fueron teñidas con los anticuerpos anti-CD4 y anti-CD25, lavadas, resuspendidas en PBS 1X y adquiridas en el sorter FACs Aria I (BD Biosciences) con el fin de aislar las células proliferantes CD4⁺CD25^{hi}CFSE⁻ (Células T reguladoras inducidas aloespecíficas) y las no proliferantes CD4⁺CD25^{hi}CFSE⁺ (Células T reguladoras inducidas no aloespecíficas). La identificación de ambas poblaciones se realizó en base a la pérdida o no del marcador de proliferación celular CFSE y expresión del marcador CD25 en las células T “naïve”, que fueron cocultivadas por 7 días en presencia de células dendríticas alogénicas irradiadas. Las células separadas se colectaron en medio RPMI/20% FBS, lavadas dos veces, resuspendidas en el medio de cultivo OpTmizer™ CTST™ T-Cell Expansion (Gibco) y puestas en cultivo con sólo 50 U/ml IL-2 durante 3 días (**reposo**). Al 3er día, las células se lavaron con medio de cultivo y se cultivaron en presencia de los siguientes estímulos: perlas anti-CD3/CD28, 5 ng/ml TGF- β 1, 100 U/ml IL-2 y 100 ng/ml RAPA por 4 días (**expansión**) con un re-estímulo de IL-2 (100 U/ml) en la mitad de la expansión. Una alícuota celular se utilizó para evaluar su fenotipo mediante tinción con los anticuerpos anti-CD4, anti-CD25, anti-CTLA-4, anti-FOXP3 y el marcador de viabilidad Aqua Zombie. Al cabo de los 4 días, se retiraron las perlas mediante un magneto y se lavaron las células para retirar todo el estímulo; previo a ello se congelaron unas alícuotas de sobrenadantes para los

ensayos de medición de citocinas. Las células se dejaron en su medio de cultivo y en presencia de solo 50 U/ml de IL-2 durante 3 días (reposo). Al cabo de los 3 días, las células se lavaron y se cultivaron en presencia de los mismos estímulos por 4 días, sólo que en esta vez las perlas anti-CD3/CD28 se añadieron en diferentes proporciones (**expansión**). Después de 4 días, se retiraron los estímulos y se dejaron en su medio de cultivo y en presencia de solo 50 U/ml de IL-2 durante 3 días (reposo). Este esquema se repitió por cuatro semanas (Figura 9). Por cada semana (4 días de expansión y 3 de reposo) se realizó un recuento, fenotipo y se congelaron los sobrenadantes y células de los cultivos.

A)



B)

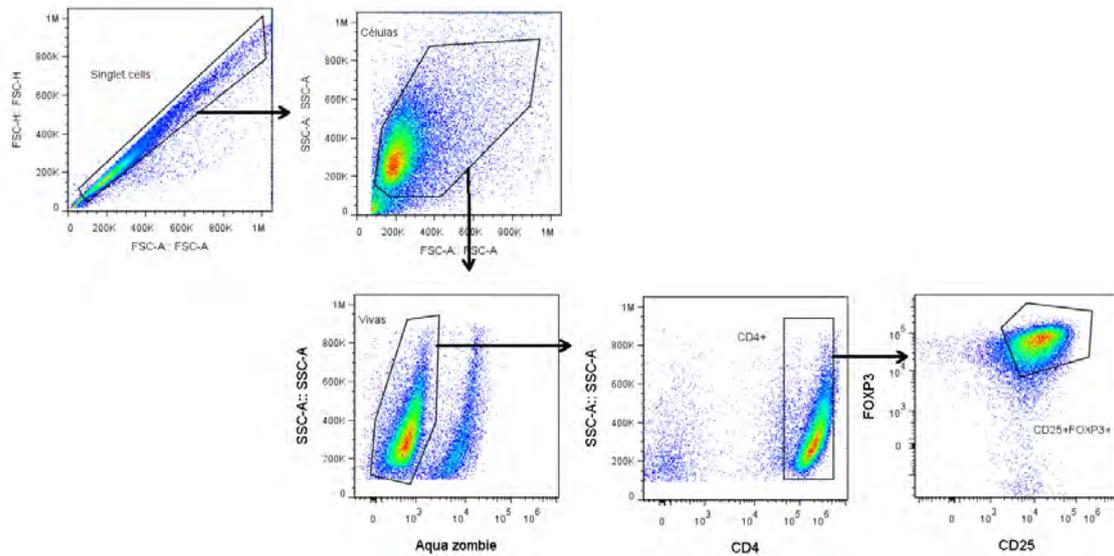


Figura 9. Representación esquemática del protocolo empleado para la generación y expansión de iTregs aloespecíficas. A) Las iTregs aloespecíficas fueron generadas mediante cocultivos con DCs alogénicas derivadas de monocitos. Las iTregs generadas fueron aisladas y expandidas por 6 semanas según el esquema señalado. B) Estrategia de análisis para la identificación del fenotipo de las células iTregs expandidas *in vitro*.

2.5 Evaluación de la estabilidad de las células T reguladoras inducidas aloespecíficamente en presencia de citocinas proinflamatorias

En la cuarta semana de expansión de las iTregs aloespecíficas, una parte de ellas fueron cultivadas en presencia de las citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α a la concentración de 10ng/ml junto con los demás estímulos señalados (perlas, TGF- β 1, IL-2 y rapamicina), por lo que se continuó con el mismo esquema de expansión y reposo durante las siguientes dos semanas.

2.6 Ensayo de supresión aloespecífica de las iTregs aloespecíficas expandidas

En la última semana de expansión de las iTregs aloespecíficas, se realizó en el ensayo de supresión aloespecífica. Para ello, 10 días antes de realizar el ensayo de supresión, se derivaron células dendríticas (cuyo donante es de quien procedieron las células dendríticas utilizadas en el cocultivo alogénico del apartado 2.2) a partir de monocitos CD14⁺ siguiendo el protocolo mencionado en el apartado 2.1. El día del ensayo de supresión, las células dendríticas se lavaron, irradiaron y resuspendieron en el medio de cultivo OpTmizer™ CTS™ T-Cell Expansion (Gibco). Además ese mismo día, se separaron mediante columnas MACS las células T CD3⁺ (cuyo donante es de la cual procedieron las iTregs aloespecíficas) que posteriormente fueron marcadas con CFSE, lavadas y resuspendidas en el medio de cultivo señalado. Finalmente, se tomaron las dos poblaciones celulares que fueron expandidas por cuatro semanas: CD4⁺CD25^{hi}CFSE⁻ (Células T reguladora inducida aloespecífica) y CD4⁺CD25^{hi}CFSE⁺ (Células T reguladoras inducidas no aloespecífica), se marcaron con CTV para luego ser lavadas y resuspendidas en el mismo medio de cultivo señalado. El marcaje con CTV permitió en el momento del análisis de datos, discriminar esta población de las células T CD3⁺ proliferantes. Para el ensayo de supresión, 40x10³ células T CD3⁺ marcadas con CFSE fueron cultivadas junto con 10x10³ células dendríticas derivadas y diferentes proporciones de células T reguladoras inducidas marcadas con CTV, y se mantuvieron en cultivos durante 4 días. Las células T CD3⁺ y células dendríticas se encuentran en proporciones de 4 a 1. Las proporciones de células T reguladoras inducidas frente a las células T CD3⁺ fueron de 1:2, 1:8 y 1:32. Al finalizar el cultivo, las células fueron teñidas con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8, y adquiridas con el citómetro de flujo Attune® NxT (Life Technologies). El porcentaje de proliferación aloespecífica de las células T CD4⁺ y T CD8⁺ (Células T respondedoras) en presencia y ausencia de células

T reguladoras inducidas, fue determinado mediante la dilución del marcador celular CFSE. La supresión fue calculada como inhibición relativa usando la misma fórmula señalada en el apartado 1.3.

2.7 Ensayo de producción de citocinas

Se midieron los niveles de las citocinas IL-2, IL10 e IFN- γ en los sobrenadantes de los cultivos de expansión de las iTregs aloespecíficas y de los cocultivos provenientes de los ensayos de supresión aloespecífica, mediante el Kit de inmunoensayo basado en perlas LEGENDplex (Biolegend) siguiendo las instrucciones del inserto y señalado en el apartado 1.4. La concentración de las citocinas en los sobrenadantes fue determinada mediante una curva estándar generada en el mismo ensayo. Los experimentos fueron realizados en cuadruplicados y repetidos dos veces.

2.8 Evaluación de la estabilidad de las células T reguladoras inducidas aloespecíficamente en ausencia de los estímulos de inducción

En la cuarta semana de expansión de las iTregs aloespecíficas, una parte de ellas fueron cultivadas en ausencia de TGF- β 1 y rapamicina durante las dos semanas siguientes. En otro ensayo, las iTregs aloespecíficas expandidas por 6 semanas, fueron marcadas con CTV y cultivadas en presencia o ausencia de TGF- β 1 y/o rapamicina durante una semana. En ambos casos, se respetó la concentración de los otros estímulos (perlas e IL-2) además del esquema de expansión y reposo.

3. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados usando el programa estadístico Prism 5.0 software (GraphPad Software, San Diego CA). Los resultados se expresaron como la media \pm SEM y se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para comprobar la normalidad de

cada grupo de estudio. Como los grupos evaluados no siguieron una distribución normal, se utilizó la prueba no paramétrica U Mann-Whitney para comparar la diferencia entre dos grupos. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

1. ANALISIS DEL FENOTIPO Y FUNCION DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS CIRCULANTES EN PACIENTES ESTABLES CON TRASPLANTE RENAL.

1.1 Características clínicas y demográficas de los pacientes con trasplante renal

Las características clínicas y demográficas de los pacientes con trasplante renal que participaron en el estudio se encuentran resumidas en la tabla 3. No se encontraron diferencias clínicas ni demográficas entre ambos grupos Belatacept y Ciclosporina, aunque los pacientes con BLT presentan una mejor y estable función renal, evidenciado por los niveles de creatinina en el suero y el índice de filtración glomerular (cGFR), al compararlos con los pacientes bajo tratamiento con Ciclosporina. Tampoco se encontraron diferencias en la cantidad de años que llevan trasplantados y en el número total de incompatibilidades de HLA, entre ambos grupos de estudio. El grupo control incluyó 9 individuos (8 mujeres y 1 hombre) comparables en cuanto a edad y sexo con ambos grupos trasplantados. Además, no se encontraron diferencias en cuanto al recuento de linfocitos en sangre periférica, entre los tres grupos evaluados (BLT= $3.2 \pm 1.7 \times 10^3$ células/ μ l sangre, CsA= $2.5 \pm 1.0 \times 10^3$ células/ μ l sangre, Control= 2.5 ± 0.5 células $\times 10^3$ / μ l sangre).

Tabla 3. Características clínicas y demográficas de los pacientes con trasplante renal y controles

	Belatacept (n=24)	Ciclosporina A (n=11)	Control (n=9)	Valor P
Edad (años)	31.08 ± 10.1 (18-57)	28.9 ± 10.7 (18-50)	35 ± 10.5 (24- 54)	0.565
Género (F/M)	10/14	3/8	1/8	0.478
Edad del donante (años)	36.12 ± 9.47 (21-54)	37.81 ± 9.34 (23-52)	ND	0.625
Género del donante (F/M)	17/7	6/5	ND	0.451
Haplotipos (2-H/ 1-H/0-H)	2/14/8	2/6/3	ND	0.755
Causa ESRD	Unk: 18 DM: 3 GMN: 3	Unk: 9 DM: 0 GMN: 2	ND	0.672
SCr 1 año post-TR (mg/dl)	1.05 ± 0.19 (0.7-1.4)	1.34 ± 0.27 (0.95-1.83)	ND	0.0011
SCr actual (mg/dl)	1.03 ± 0.304 (0.66-2.03)	1.48 ± 0.43 (0.9-2.1)	ND	0.0012
cGFR 1 año post-TR (ml/min) por MDRD	79.01 ± 15.6 (56.1-126.2)	63.81 ± 9.1 (50.9-78.9)	ND	0.0056
cGFR actual (ml/min) por MDRD	79.6 ± 16.5 (40.1-107.7)	56.8 ± 13.6 (38.1-76.1)	ND	0.0004
Nivel sanguíneo de CsA 1- año post-TR (ng/ml)	ND	155.9 ± 36.2 (112-228.7)	ND	
Nivel sanguíneo actual de CsA (ng/ml)	ND	132.8 ± 40.1 (65.6-189.4)	ND	
Tiempo de trasplante (yrs)	7.28 ± 0.91 (5.9-8.67)	7.11 ± 0.83 (5.9-8.22)	ND	0.606
Linfocitos en sangre periférica (cells/μl blood)	3.2 ± 1.7 x 10 ³	2.5 ± 1.0 x 10 ³	2.5 ± 0.5 x 10 ³	0.478

ESRD= Enfermedad renal en etapa terminal; Unk=desconocido;

GMN=glomerulonefritis; DM=diabetes mellitus; *SCr*=Nivel de creatinina en el suero;

TR=trasplante renal; *cGFR*= Índice de filtración glomerular; MDRD= Modificación de

la dieta en la enfermedad renal; CsA=ciclosporina A; ND: No disponible

1.2 Los pacientes bajo tratamiento con Belatacept presentan una frecuencia incrementada de linfocitos T CD4⁺CD45RA⁺ circulantes

Con el fin de evaluar algún efecto del tratamiento inmunosupresor prolongado sobre las subpoblaciones de linfocitos T circulantes, se aislaron las CMSP de los pacientes trasplantados y se marcaron con anticuerpos específicos para su análisis por Citometría de flujo. No se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias de los linfocitos periféricos (CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ y CD19⁺) de los pacientes bajo tratamiento con BLT y CsA al compararlos con el grupo control (Figura 10A). Aunque la frecuencia de las células T CD4⁺ fue similar entre los tres grupos de estudio (Figura 10B, izquierda), los pacientes bajo tratamiento con BLT presentaron un mayor porcentaje de linfocitos T circulantes CD4⁺CD45RA⁺ al ser comparado con los grupos CsA y control (BLT= 61.04 ± 3.74; CsA= 48.03 ± 3.97; Control= 40.56 ± 4.92; p<0.05) (Figura 10B, derecha).

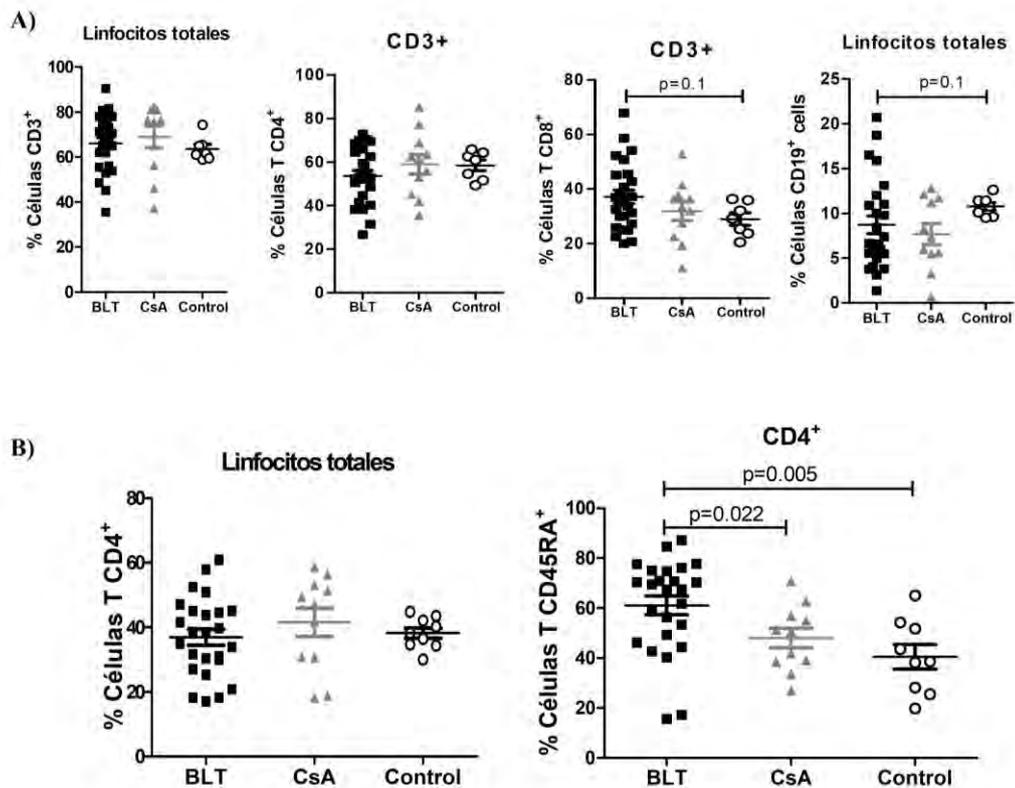


Figura 10. Mayor frecuencia de células TCD4⁺ vírgenes en pacientes tratados con Belatacept. (A) No se encuentran diferencias en los porcentajes de células CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ entre los pacientes con BLT (n=24) y CsA (n=11) al compararlos con el grupo control (n=9), aunque se observa una ligera reducción de células B (CD19⁺) en pacientes tratados con BLT. (B) El análisis de la población de células T CD4⁺ vírgenes muestra un incremento significativo en la frecuencia de células T CD4⁺CD45RA⁺ en pacientes con BLT al ser comparada con los grupos CsA y control. Las frecuencias de las diferentes subpoblaciones de linfocitos fueron determinadas siguiendo la estrategia de análisis mostrada en la figura 7. Los nombres ubicados en la parte superior de cada gráfica de puntos corresponden a la población de donde fue estimado el porcentaje de células señaladas en la parte izquierda de la gráfica correspondiente. Cada punto indica el valor calculado para cada uno de los individuos que participaron en el estudio. El análisis estadístico se realizó usando la prueba no paramétrica Mann-Whitney, dos colas. BLT, Belatacept; CsA, Ciclosporina A. El grupo control esta conformado de individuos sanos.

1.3 Las células T CD4⁺ de pacientes con Belatacept presentan una menor frecuencia de FOXP3 con una expresión reducida de FOXP3 y CD25

Debido al impacto que podrían tener el tratamiento inmunosupresor BLT y CsA sobre las células T reguladoras circulantes en pacientes trasplantados, se decidió primero evaluar la expresión de marcadores típicos de las Tregs (FOXP3 y CD25) en las células T CD4⁺ totales. Dentro de la población T CD4⁺ circulante, el porcentaje de células FOXP3⁺ en ambos grupos trasplantados fue significativamente menor con respecto al grupo control (BLT = 5.81 ± 0.47 ; CsA= 4.57 ± 0.32 ; Control= 7.94 ± 0.48 ; $p < 0.01$) (Figura 11A). Además, la expresión de FOXP3 (evaluado como IMF, por sus siglas en inglés Intensidad Media de Fluorescencia) (BLT= $28,731 \pm 3,639$; CsA= $42,362 \pm 6,687$; Control= $49,964 \pm 3,108$; $p < 0.005$) y CD25 (BLT= $12,509 \pm 839.1$; CsA= $18,612 \pm 2,728$; Control= $16,111 \pm 808.6$; $p < 0.05$) fue significativamente reducido en los pacientes bajo tratamiento con Belatacept, al ser comparados con el grupo CsA y control. Los valores de IMF de cada individuo fueron calculados sustrayendo los valores IMF de la subpoblación que no expresa el marcador de su correspondiente subpoblación que expresa el marcador. No se observan diferencias de expresión de FOXP3 y CD25 entre los grupos CsA y control (Figura 11B).

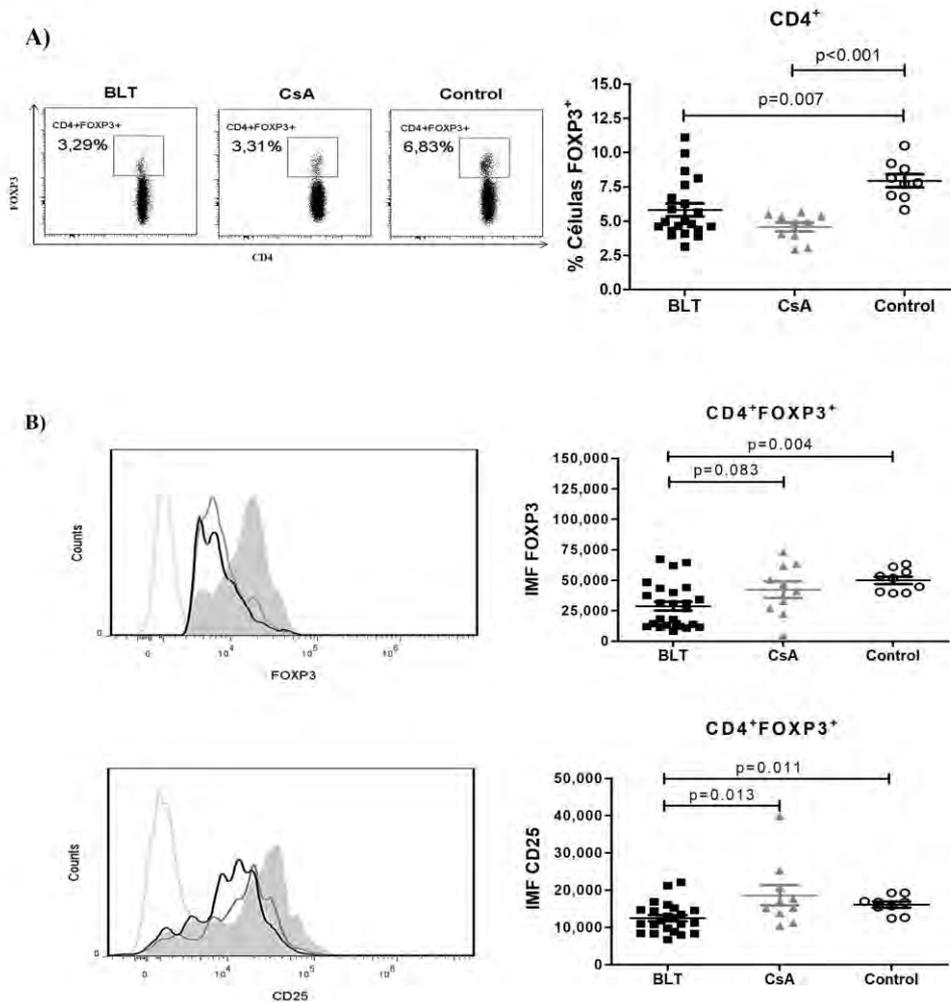


Figura 11. Las células T CD4⁺ provenientes de pacientes bajo tratamiento con Belatacept presentan una menor frecuencia de células FOXP3⁺ con niveles reducidos de FOXP3 y CD25. (A) Menor frecuencia de células T CD4⁺FOXP3⁺ en pacientes bajo tratamiento con BLT (n=21) y CsA (n=10) al compararlos con el grupo control (n=9). El panel de la izquierda muestra los dot plots representativos de los pacientes y controles. (B) Niveles de expresión de FOXP3 y CD25 dentro de la subpoblación de CD4⁺, calculado como IMF, señalando una reducción significativa en pacientes tratados con BLT al compararlos con los grupos de CsA y control. Los valores de IMF de cada individuo fueron calculados sustrayendo los valores IMF de la subpoblación que no expresa el marcador de su correspondiente subpoblación que expresa el marcador. Los paneles de la izquierda muestran los histogramas representativos de un individuo del grupo BLT (línea negra sólida), CsA (línea gris sólida) y control (histograma lleno); la línea punteada es un control FMO (“Fluorescence minus one” todos los anticuerpos menos uno). Las frecuencias de las diferentes subpoblaciones de linfocitos fueron determinadas siguiendo la estrategia de análisis mostrada en la figura 7. Los nombres ubicados en la parte superior de cada gráfica de puntos corresponden a la población de donde fue estimado el porcentaje de células o valores de IMF señaladas en la parte izquierda de la gráfica correspondiente. Cada punto indica el valor calculado para cada uno de los individuos que participaron en el estudio. El análisis estadístico se realizó usando la prueba no paramétrica Mann-Whitney, dos colas. BLT, Belatacept; CsA, Ciclosporina A. El grupo control esta conformado de individuos sanos.

1.4 Los pacientes con trasplante renal presentan una menor frecuencia de células T reguladoras CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo/-}

Debido a que en células humanas, el CD25 no permite distinguir entre células T convencionales y células T reguladoras, se utilizó el fenotipo CD25^{hi} y CD127^{lo/-} para una identificación más confiable de esta población como fue reportado por otros trabajos [218]. Como se observa en la Figura 12A, dentro de la región CD4⁺ se observó una disminución significativa de la proporción de células T CD25^{hi}CD127^{lo/-} en ambos grupos BLT y CsA con respecto al control (BLT= 3.31 ± 0.25 ; CsA= 3.83 ± 0.51 ; Control= 5.28 ± 0.36 ; $p < 0.05$). Como consecuencia, la frecuencia de células T CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo/-}FOXP3⁺ también se encuentra significativamente reducida en ambos grupos trasplantados al ser comparados con el grupo control (BLT= 2.81 ± 0.22 ; CsA= 2.97 ± 0.44 ; Control= 4.69 ± 0.36 ; $p < 0.05$) (Figura 12B) lo cual se correlacionó con una disminución significativa en la expresión de FOXP3 dentro de la población CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo/-}FOXP3⁺ en ambos grupos trasplantados respecto al grupo control (BLT= $29,099 \pm 5,020$; CsA= $36,840 \pm 9,520$; Control= $65,997 \pm 5,026$; $p < 0.05$) (Figura 12C, panel de arriba). Además, la expresión de CD25 dentro de la misma población también se encuentra reducida de manera significativa en los pacientes bajo tratamiento con Belatacept, al ser comparados con el grupo CsA y control, pero no se encontraron diferencias de expresión de CD25 entre el grupo CsA y control (BLT= $20,701 \pm 1,363$; CsA= $28,447 \pm 3,859$; Control= $24,389 \pm 1,154$; $p < 0.05$) (Figura 12C, panel inferior).

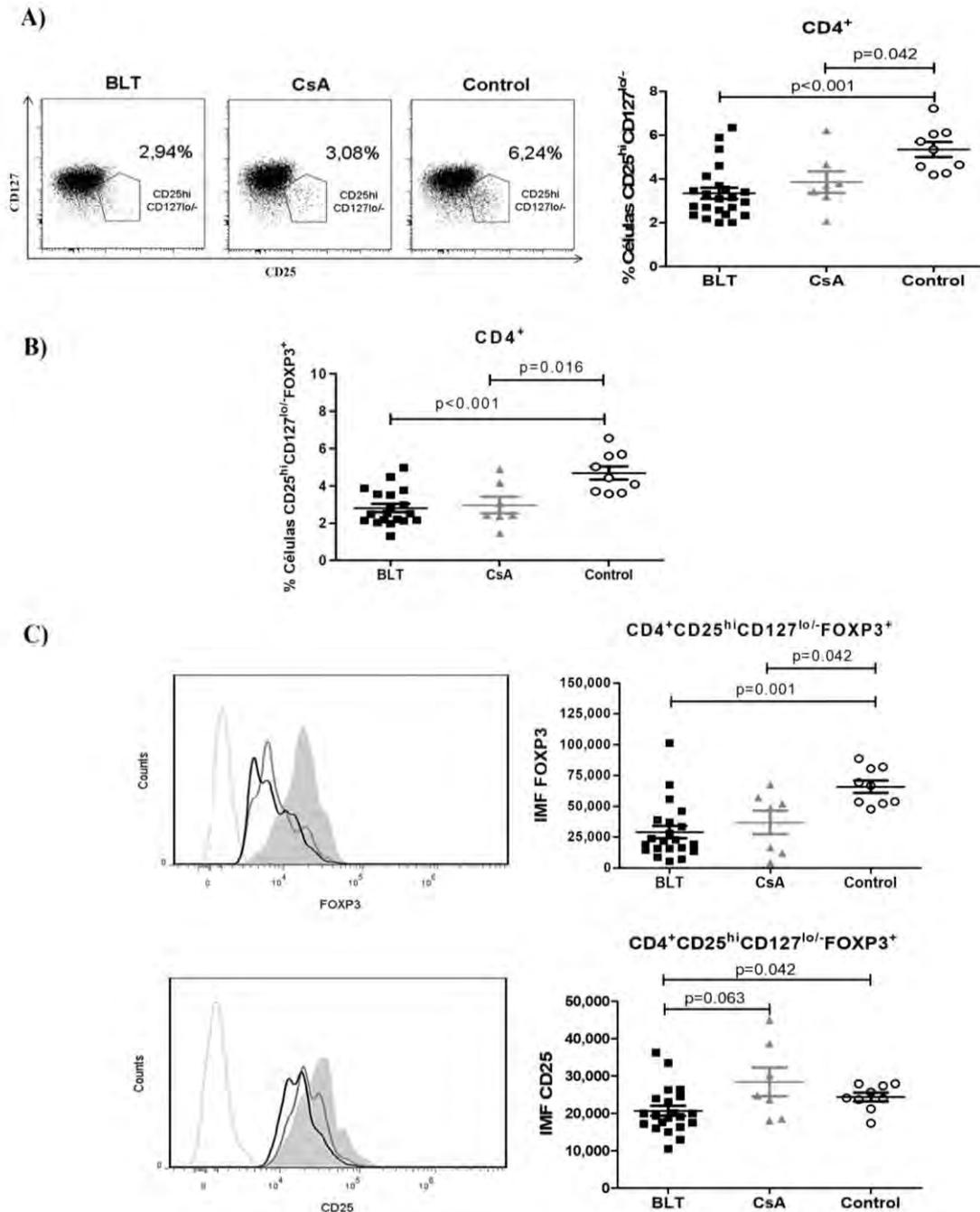


Figura 12. Las células T CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo/-}FOXP3⁺ periféricas (Tregs) de los pacientes con trasplante renal muestran una reducción en su frecuencia y niveles de expresión de FOXP3. La frecuencia de células T CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo/-} (A) y de células T CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo/-}FOXP3⁺ (B) de los pacientes trasplantados (BLT=12 and CsA=7) se encuentra reducida en comparación con el grupo control (n=9). El panel de la izquierda muestra los dotplots representativos de pacientes y controles. (C) Los niveles de expresión de marcadores característicos de Tregs muestra una reducción significativa de FOXP3 y CD25 en las Tregs de los pacientes tratados con BLT. Los valores de IMF de cada individuo fueron calculados sustrayendo los valores IMF de la subpoblación que no expresa el marcador de su correspondiente subpoblación que expresa el marcador. Los paneles de la izquierda muestran los histogramas representativos de un individuo del grupo BLT (línea negra sólida), CsA (línea

gris sólida) y control (histograma lleno); la línea punteada es un control FMO (todos los anticuerpos menos uno).). Las frecuencias de las diferentes subpoblaciones de linfocitos fueron determinadas siguiendo la estrategia de análisis mostrada en la figura 7. Los nombres ubicados en la parte superior de cada gráfica de puntos corresponden a la población de donde fue estimado el porcentaje de células o valores de IMF señaladas en la parte izquierda de la gráfica correspondiente. Cada punto indica el valor calculado para cada uno de los individuos que participaron en el estudio. El análisis estadístico se realizó usando la prueba no paramétrica Mann-Whitney, dos colas. BLT, Belatacept; CsA, Ciclosporina A. El grupo control esta conformado de individuos sanos.

Es interesante señalar que algunos pacientes trasplantados mostraron un porcentaje reducido de células FOXP3⁺ dentro de la región CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo/-}, siendo significativo en pacientes bajo tratamiento con CsA cuando se compara con el grupo control (76.80 ± 2.83 versus 88.46 ± 1.20; p= 0.002) (Figura 13A). Además, algunos pacientes del grupo CsA (3 de 7) presentaron células FOXP3⁺ en otra región fuera de la característica CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo/-} (Figura 13B).

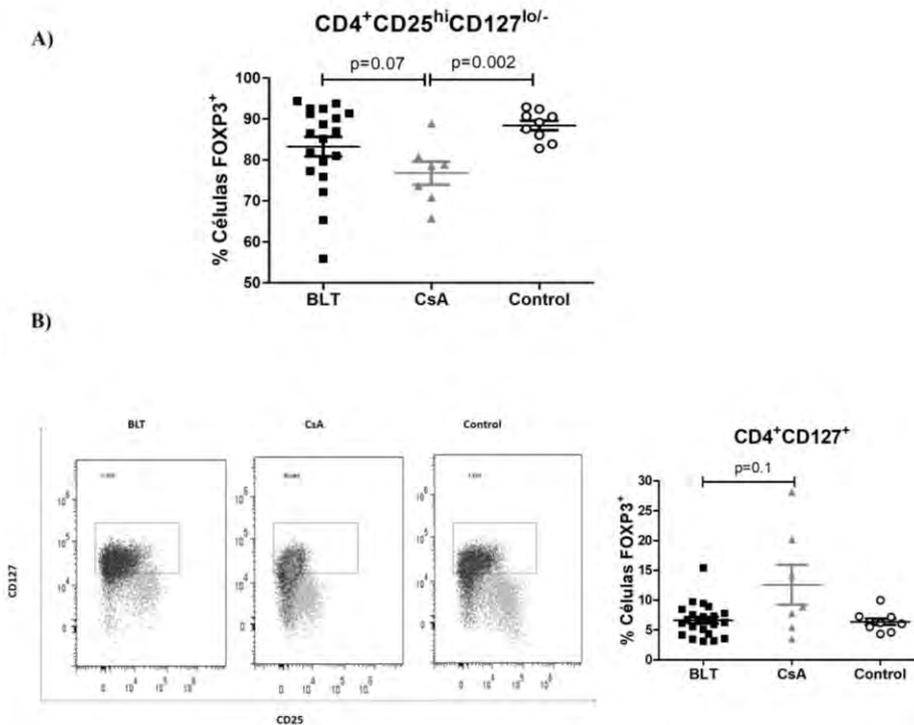


Figura 13. Presencia de células FOXP3⁺ que expresan CD127 en pacientes bajo tratamiento con CsA. (A) Análisis del porcentaje de células FOXP3⁺ dentro de la subpoblación de CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo/-} en pacientes trasplantados, mostrando que algunos de ellos presentan un porcentaje reducido de células FOXP3⁺ dentro de la región CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo/-}, siendo significativo en pacientes bajo tratamiento con CsA (B) La reducción de Tregs con fenotipo

CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo/-} fue acompañada con un incremento de células FOXP3⁺ que expresan CD127 en pacientes bajo tratamiento con CsA. El panel de la izquierda muestra dotplots representativos de pacientes y controles, donde se señalan a las células FOXP3⁺ como puntos grises y que preferencialmente están ubicadas en la región CD25^{hi}CD127^{lo/-}, aunque también se puede observar otros eventos grises en la región CD127⁺ del paciente con CsA. Los nombres ubicados en la parte superior de cada gráfica de puntos corresponden a la población de donde fue estimado el porcentaje de células señaladas en la parte izquierda de la gráfica correspondiente. Cada punto indica el valor calculado para cada uno de los individuos que participaron en el estudio. El análisis estadístico se realizó usando la prueba no paramétrica Mann-Whitney, dos colas. BLT, Belatacept; CsA, Ciclosporina A. El grupo control está conformado de individuos sanos.

1.5 La expresión reducida de FOXP3 en las Tregs de pacientes bajo tratamiento con Belatacept no es consecuencia de una acumulación de Tregs con fenotipo virgen

Con el fin de examinar si la expresión reducida de FOXP3 y CD25 es el resultado de cambios en la composición total de Tregs, se determinó la frecuencia de CD45RA⁺ y Helios dentro de la población de células T CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo/-}FOXP3⁺ en los pacientes trasplantados y controles. Similar a lo observado en el total de células T CD4⁺, los pacientes bajo tratamiento con Belatacept, mostraron un incremento significativo en la frecuencia de células T CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo/-} FOXP3⁺CD45RA⁺ (Tregs vírgenes o “naïve”) al compararlo con el grupo control (BLT= 50.76 ± 3.89; CsA= 43.34 ± 5.19; Control= 30.78 ± 5.41; p= 0.009) (Figura 14A). Además, ambas poblaciones de Tregs (CD45RA⁺ y CD45RA⁻) procedentes de pacientes bajo tratamiento con BLT, expresan menores niveles de FOXP3 al compararlos con los controles (Figura 14B), por lo que nuestros resultados no son una consecuencia de una acumulación de Tregs “naïve” en pacientes bajo tratamiento con BLT. No se encontraron diferencias de expresión de FOXP3 en ambas poblaciones de Tregs entre el grupo CsA y control. Con respecto a la expresión de CD25, sólo la población de Tregs CD45RA⁻ del grupo Belatacept mostró una reducción significativa en sus niveles de

expresión al compararlo con el grupo CsA y control (BLT= 18375 ± 1086; CsA= 24544 ± 3585; Control= 27789 ± 1347; p<0.05) (Figura 14C).

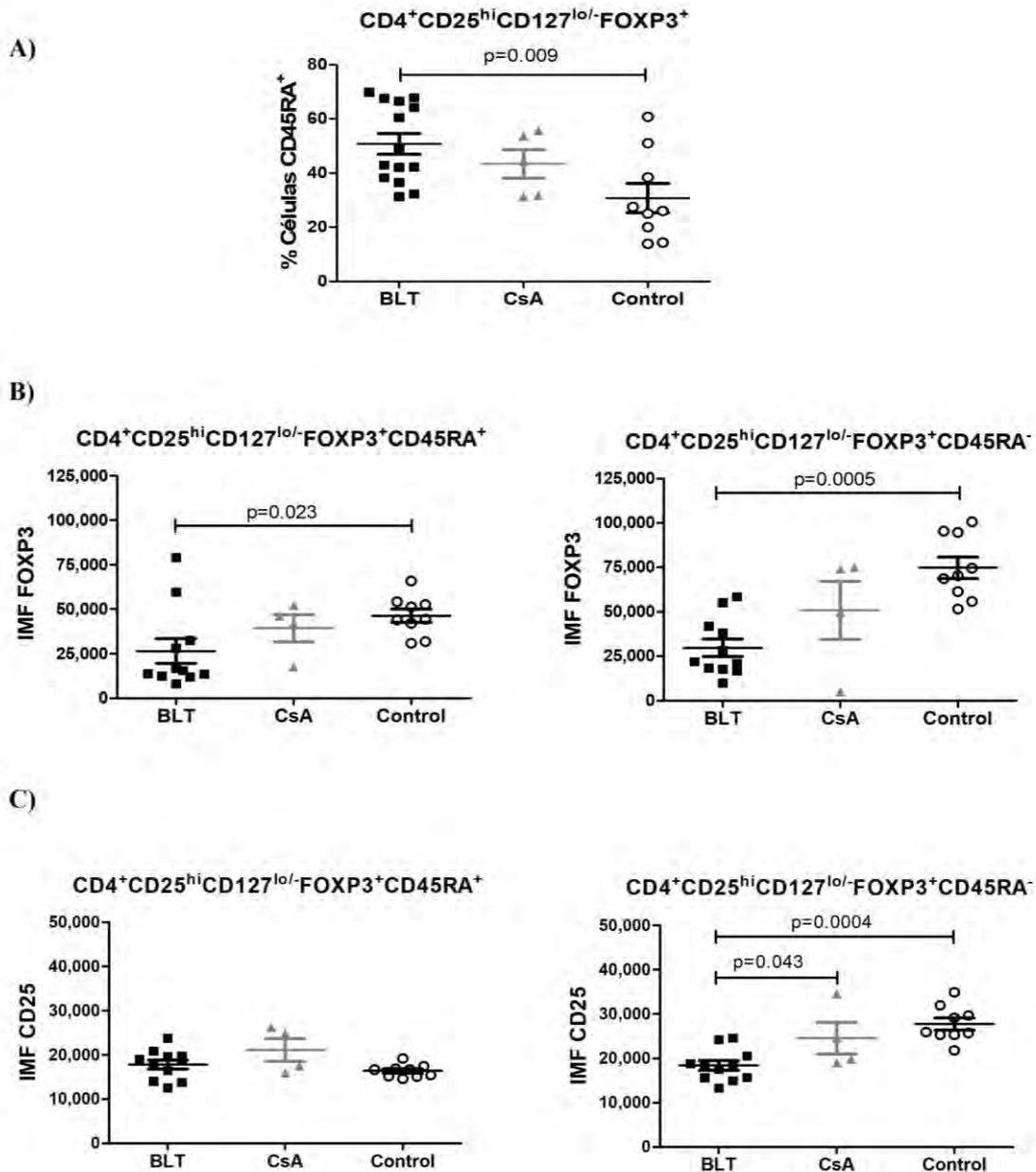


Figura 14. La expresión reducida de FOXP3 en las Tregs de los pacientes con BLT no es una consecuencia de la acumulación de Tregs con fenotipo virgen. (A) Aunque los pacientes bajo tratamiento con BLT (n=14) muestran un incremento en la frecuencia de Tregs con fenotipo virgen (B) se encontró una nivel de FOXP3 reducido en ambas subpoblaciones de Tregs: virgenes (CD45RA⁺) y activadas (CD45RA⁻) al ser comparadas con los grupos CsA (n=4) y control (n=9). (C) La expresión de CD25 fue significativamente reducida en las Tregs activadas de los pacientes BLT. Las frecuencias de las diferentes subpoblaciones de linfocitos fueron determinadas siguiendo la estrategia de análisis mostrada en la figura 7. Los valores de IMF de cada individuo fueron calculados sustrayendo los valores de IMF de la subpoblación

que no expresa el marcador de su correspondiente subpoblación que expresa el marcador. Los nombres ubicados en la parte superior de cada gráfica de puntos corresponden a la población de donde fue estimado el porcentaje de células o valores de IMF señaladas en la parte izquierda de la gráfica correspondiente. Cada punto indica el valor calculado para cada uno de los individuos que participaron en el estudio. El análisis estadístico se realizó usando la prueba no paramétrica Mann-Whitney, dos colas. BLT, Belatacept; CsA, Ciclosporina A. El grupo control esta conformado de individuos sanos.

1.6 La expresión de FOXP3 se encuentra reducida en las Tregs de pacientes tratados con Belatacept independientemente de la expresión de Helios

Helios es un factor de transcripción que coopera con FOXP3 para promover la función supresora de las Tregs, lo que sugiere que podría ser un marcador útil para la identificación de Tregs FOXP3⁺ estables. No se encontraron diferencias en cuanto la frecuencia de Tregs Helios⁺ entre los grupos estudiados (Figura 15A) dentro de la población de CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo/-}FOXP3⁺. Además, la expresión de FOXP3 dentro de las Tregs de los pacientes con BLT se encuentra significativamente reducida en ambas subpoblaciones de Tregs Helios⁺ y Helios⁻ al compararlos con el control (Figura 15B). La expresión de CD25 en ambas subpoblaciones de Tregs también se encuentra reducida en pacientes con BLT al compararlos con el control, aunque en la subpoblación Tregs Helios⁺ no alcanza la significancia (p=0.0687). Por lo tanto, la expresión de FOXP3 y CD25 se encuentra reducida en las Tregs de pacientes tratados con Belatacept independiente de la expresión de Helios.

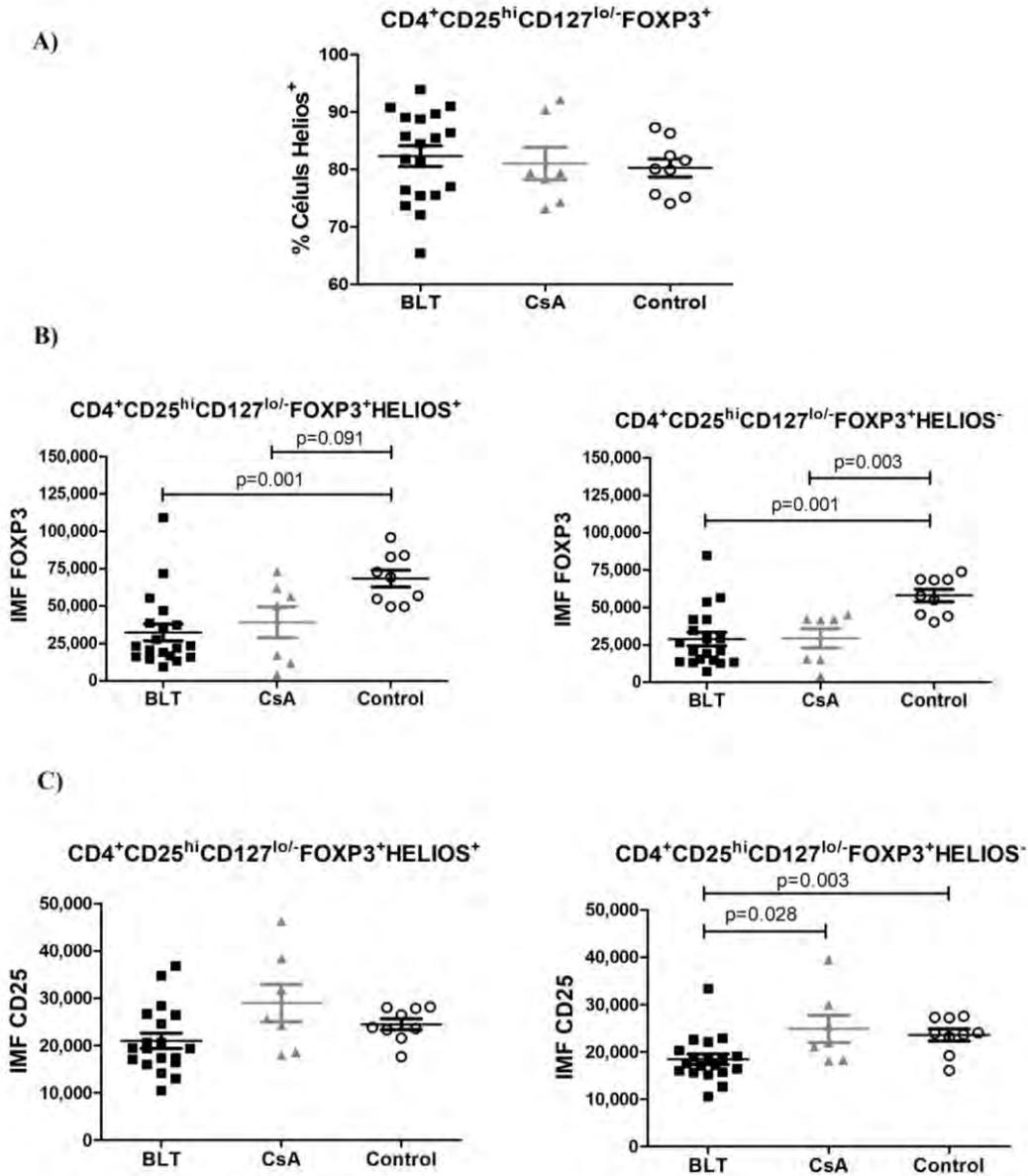


Figura 15. La expresión reducida de FOXP3 en las Tregs de los pacientes bajo tratamiento con Belatacept, es independiente de la expresión de Helios. (A) No se encontraron diferencias en la frecuencia de Helios⁺ dentro de la población de Tregs de los tres grupos evaluados. (B) La expresión de FOXP3 en los pacientes trasplantados (BLT=19 y CsA=7) se encuentra reducida en ambas subpoblaciones de Tregs: Helios⁺ (panel de la izquierda) y Helios⁻ (panel de la derecha) al ser comparadas con el grupo control (n=9). (C) La expresión de CD25 fue significativamente reducida en las Tregs Helios⁻, pero no en las Tregs Helios⁺ de los pacientes BLT. Las frecuencias de las diferentes subpoblaciones de linfocitos fueron determinadas siguiendo la estrategia de análisis mostrada en la figura 7. Los valores de IMF de cada individuo fueron calculados sustrayendo los valores de IMF de la subpoblación que no expresa el marcador de su correspondiente subpoblación que expresa el marcador. Los nombres ubicados en la parte superior de cada gráfica de puntos corresponden a la población de donde fue estimado el porcentaje de células o valores de IMF señaladas en la parte izquierda de la gráfica correspondiente. Cada punto indica el valor calculado para cada uno de los individuos

que participaron en el estudio. El análisis estadístico se realizó usando la prueba no paramétrica Mann-Whitney, dos colas. BLT, Belatacept; CsA, Ciclosporina A. El grupo control esta conformado de individuos sanos.

1.7 Las células T reguladoras de los pacientes con trasplante renal presentan una función supresora disminuída

Para determinar si el tratamiento inmunosupresor a largo plazo tiene algún efecto sobre la función de las Tregs se estudió la actividad supresora *in vitro* de estas células. Para ello, se purificaron las células T CD4⁺CD25^{hi} de cada grupo para los ensayos de supresión *in vitro*. Dado que el porcentaje de Tregs dentro de las CD4⁺ se encuentra reducida en los pacientes trasplantados (Figura 12B), se aislaron y utilizaron las Tregs que contuvieran más del 85% de células FOXP3⁺ dentro de la región CD25 (región CD4⁺CD25^{very hi}, Figura 16A) de manera similar al control. Las células T CD4⁺CD25^{hi} del grupo control fueron capaces de suprimir la proliferación de las células T respondedoras CD4⁺ y CD8⁺ en todas las proporciones evaluadas. Sin embargo, las células T CD4⁺CD25^{hi} provenientes de ambos grupos trasplantados mostraron una supresión reducida incluso en la proporción más alta de Treg: Tresp utilizada (BLT= 19.52 ± 5.16; CsA=17.74 ± 6.81; Control= 51.03 ± 5.52 en la proporción 1:2; p<0.01) y CD8⁺ (BLT= 17.31 ± 4.83; CsA= 21.67 ± 3.20; Control= 53.31 ± 5.66 en la proporción 1:2; p<0.01) (Figura 17), que podría estar asociado a los niveles reducidos de FOXP3 y CD25 observados en las células T CD4⁺CD25^{hi} aisladas de los pacientes trasplantados (Figura 116B). No se encontraron diferencias significativas de capacidad supresora de las Tregs entre los grupos de BLT y CsA. Además, es importante señalar que en ausencia de las Tregs, las células T respondedoras provenientes de los pacientes trasplantados son capaces de proliferar de igual manera que al grupo control después de la estimulación anti-TCR con las perlas anti CD3/CD28 (Figura 18).

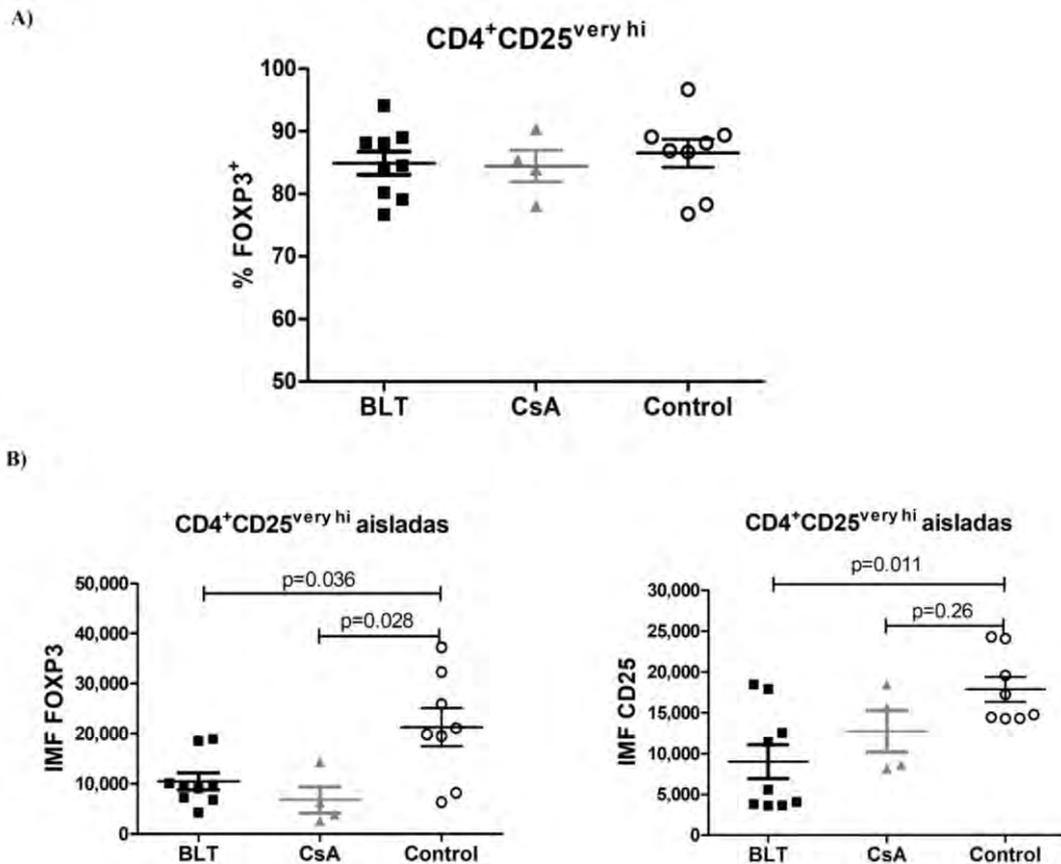


Figura 16. Las células T CD4⁺CD25^{very hi} separadas y usadas en los ensayos de supresión y análisis de metilación del DNA de la región FOXP3 TSDR, fueron FOXP3⁺ y sin diferencia de pureza entre los pacientes trasplantados y el grupo control. (A) Se empleó la región CD4⁺CD25^{very hi} para separar las Tregs que contenga una mayor pureza de células FOXP3⁺ (media > 85%), no encontrándose diferencias en cuanto al porcentaje de células FOXP3⁺ dentro de las Tregs separadas entre los grupos evaluados. (B) Sin embargo, los valores de IMF de FOXP3 y CD25 de las células T CD4⁺CD25^{very hi} aisladas de ambos grupos trasplantados fueron reducidos al ser comparados con el control. La estrategia de aislamiento de las células Tregs se muestra en la figura 8 A de la sección Materiales y métodos. Los valores de IMF de cada individuo fueron calculados sustrayendo los valores de IMF de la subpoblación que no expresa el marcador de su correspondiente subpoblación que expresa el marcador. Los nombres ubicados en la parte superior de cada gráfica de puntos corresponden a la población de donde fue estimado el porcentaje de células o valores de IMF señaladas en la parte izquierda de la gráfica correspondiente. Cada punto indica el valor calculado para cada uno de los individuos que participaron en el estudio. El análisis estadístico se realizó usando la prueba no paramétrica Mann-Whitney, dos colas. BLT, Belatacept; CsA, Ciclosporina A. El grupo control esta conformado de individuos sanos.

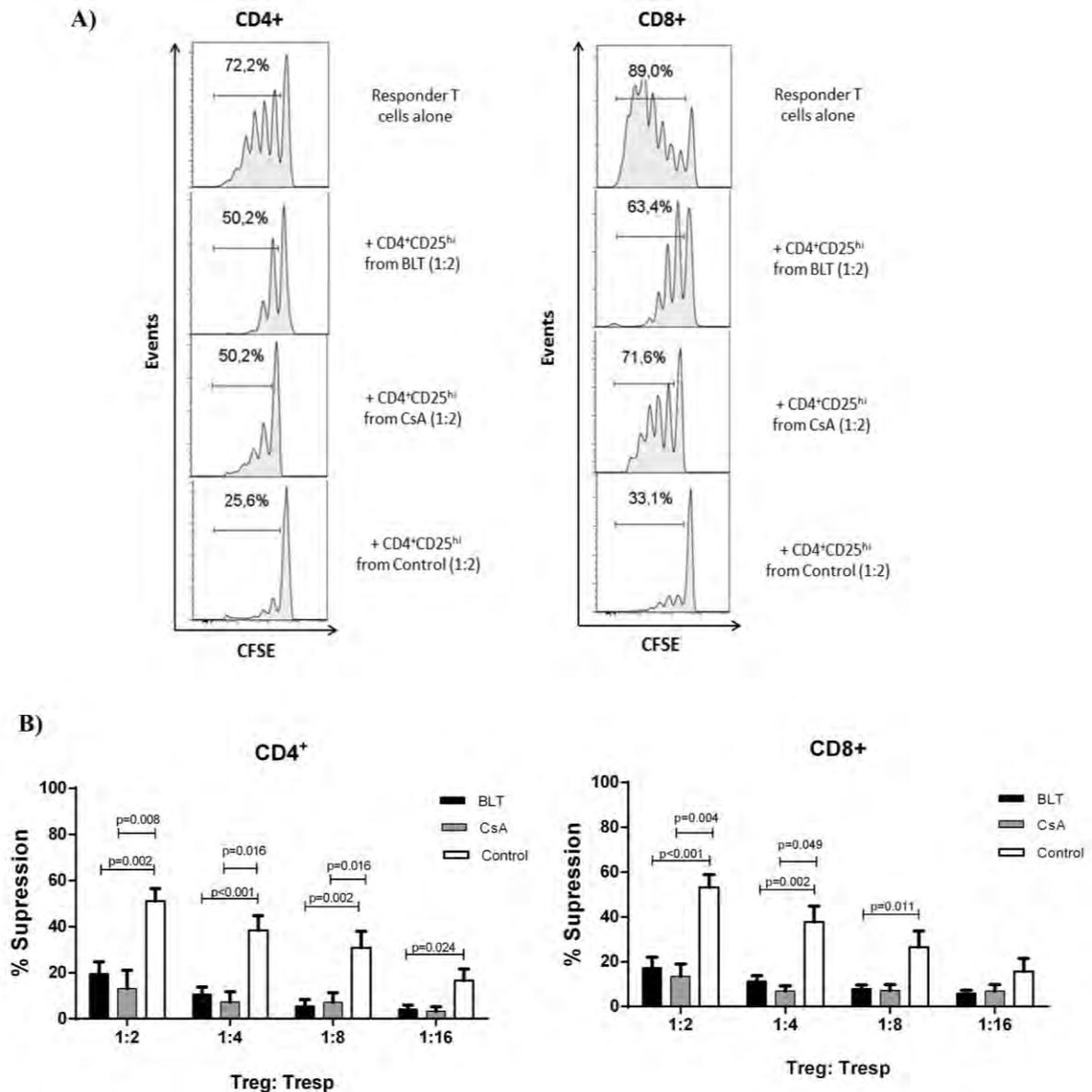


Figura 17. Disminución de la capacidad supresora en las Tregs de pacientes trasplantados
 (A) Los histogramas muestran la proliferación de las células T CD3⁺ en ausencia (solo células T respondedoras) o presencia de Tregs de los pacientes trasplantados (BLT y CsA) o individuos sanos (control), los números indican el porcentaje de proliferación. (B) Las células T CD4⁺CD25^{hi} (Tregs) aisladas de los pacientes con BLT (barras negras, n=9) o CsA (barras grises, n=4) muestran una menor supresión de la proliferación de las células T respondedoras CD4⁺ y CD8⁺ (Tresp), en todas las proporciones Tregs: Tresp evaluadas, al ser comparadas con el grupo control (barras blancas, n=8). La supresión fue calculado usando la siguiente formula: [(proliferación Tresp sin Tregs-proliferación Tresp con Tregs)/proliferación Tresp sin Tregs] x 100. El análisis estadístico se realizó usando la prueba no paramétrica Mann-Whitney, dos colas. BLT, Belatacept; CsA, Ciclosporina A. El grupo control esta conformado de individuos sanos.

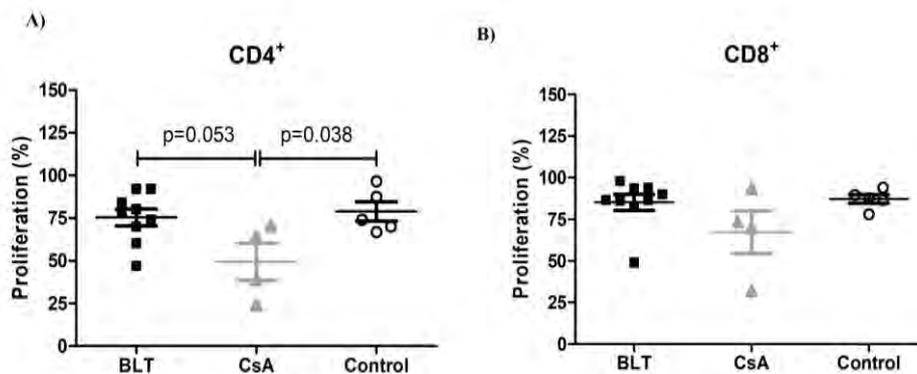


Figura 18. Las células T respondedoras provenientes de los pacientes trasplantados son capaces de proliferar de igual manera que el grupo control. Las gráficas muestran el porcentaje de proliferación de las células T respondedoras provenientes de los grupos evaluados, al ser estimulados con perlas anti CD3/CD28 por cuatro días. No se encuentran diferencias en la proliferación de células T CD4⁺ (A) y CD8⁺ (B) entre los pacientes con BLT y el grupo control. Las células T respondedoras de los pacientes con CsA muestran una proliferación reducida de células T CD4⁺, aunque la proliferación de células T CD8⁺ es similar a los demás grupos. Los nombres ubicados en la parte superior de cada gráfica de puntos corresponden a la población de donde fue estimado el porcentaje de proliferación. Cada punto indica el valor calculado para cada uno de los individuos que participaron en el estudio. El análisis estadístico se realizó usando la prueba no paramétrica Mann-Whitney, dos colas. BLT, Belatacept; CsA, Ciclosporina A. El grupo control esta conformado de individuos sanos.

1.8 Las células T reguladoras de los pacientes tratados con Belatacept disminuyen ligeramente la producción de IFN- γ por las células T activadas

Para investigar si la incapacidad de las Tregs provenientes los pacientes trasplantados para inhibir la proliferación de las células T respondedoras está relacionada a una reducción en la producción de citocinas por parte de estas células, se analizó la producción de citocinas en los sobrenadantes de los cultivos del mismo ensayo de supresión. Como se muestra en la Figura 19A, se encontró una disminución en la producción de IFN- γ en los cocultivos de células T respondedoras con Tregs (barras negras) de los tres grupos evaluados, aunque esta reducción fue ligeramente menor en los pacientes tratados con BLT al ser comparados con el grupo CsA y control. Interesantemente, aunque la producción de IL-2 en la condición “sólo T respondedoras” fue similar entre el grupo control y BLT, los niveles de IL-2 no fueron reducidos en los

cocultivos de estos pacientes al ser comparados con el grupo control (Figura 19B). Por otro lado, se encontró una producción reducida de IL-2 en la condición “sólo células T respondedoras” y los cocultivos de los pacientes tratados con CsA.

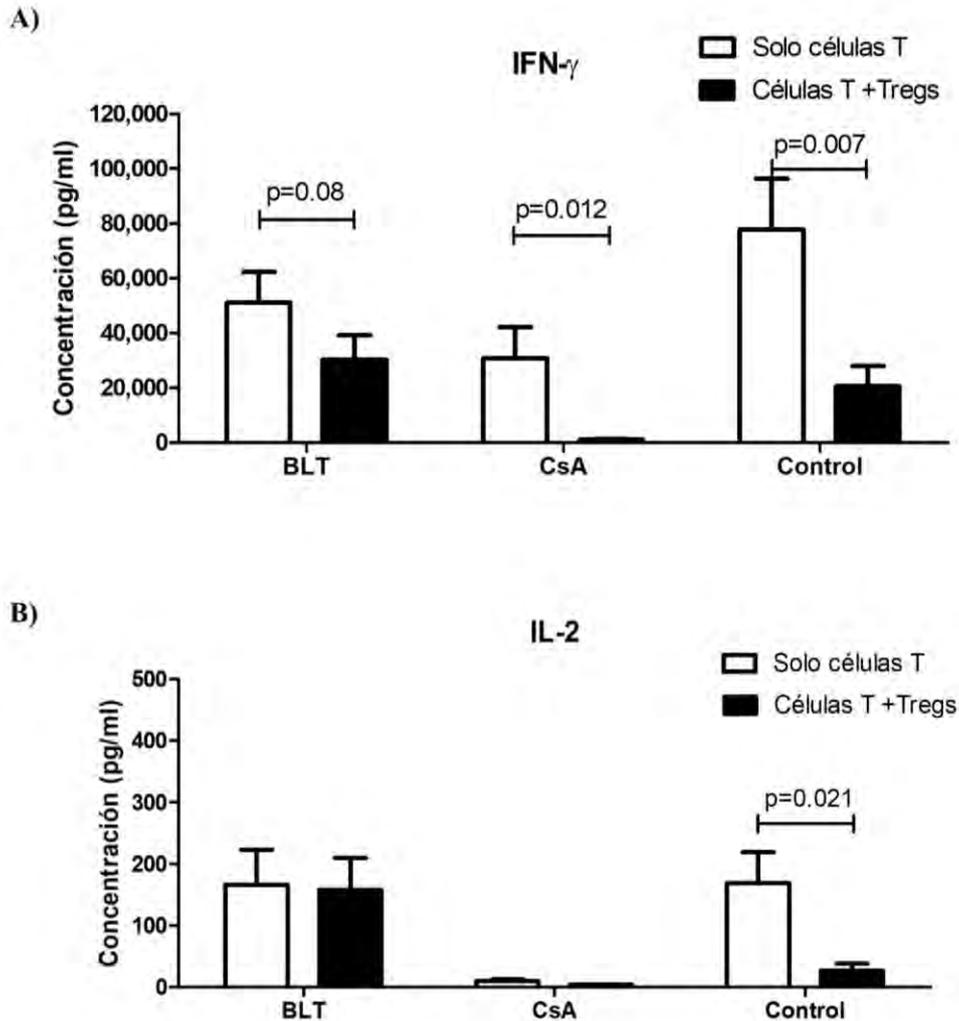


Figura 19. Nivel de producción de IFN- γ e IL-2 en los ensayos de supresión de los pacientes trasplantados. Mediante el Kit de inmunoensayo basado en perlas (CBA) se midieron las citocinas del sobrenadante de los cultivos de los ensayos de supresión de los pacientes trasplantados y grupo control, después de un estímulo con perlas anti-CD3/CD28 (células T respondedoras solas) o cocultivadas con Tregs autólogas por 4 días. (A) Las células T respondedoras de los pacientes trasplantados producen IFN- γ después del estímulo con anti-CD3/CD28 de manera similar a los controles, la cual se redujo en presencia de las Tregs autólogas, aunque las Tregs de los pacientes con BLT sólo reducen ligeramente la producción de IFN- γ por las células T activadas. (B) Se observaron alteraciones en la producción de IL-2 en los sobrenadantes de los pacientes trasplantados al compararlas con el grupo control. Las células T respondedoras de los pacientes con BLT, pero no CsA, producen niveles normales de IL-2. La altura de cada barra representa la media del conjunto de datos obtenidos por cada condición

evaluada. El análisis estadístico se realizó usando la prueba no paramétrica Mann-Whitney, dos colas. BLT, Belatacept; CsA, Ciclosporina A. El grupo control esta conformado de individuos sanos.

1.9 La región TSDR del gen FOXP3 se encuentra metilada en las células T reguladoras de los pacientes tratados con Belatacept y Ciclosporina A

Reportes previos señalaron que una expresión estable de FOXP3 es importante para mantener la función de las Tregs [219], por lo tanto el siguiente ensayo fue analizar el estado de metilación de la región TSDR del gen FOXP3 de células T CD4⁺CD25^{hi} aisladas de los pacientes trasplantados y controles, los cuales previamente fueron usados en los ensayos de supresión (región CD4⁺CD25^{very hi}, Figura 16A). Como el gen FOXP3 se encuentra localizado en el cromosoma X, se evaluaron sólo en hombres. Los resultados fueron reportados como porcentaje de secuencias CpGs metiladas (de un total de 15) a partir de 5 clonas positivas obtenidos de cada individuo. Cuando se analizó el porcentaje de metilación de todos los sitios CpG secuenciados, se observó una variabilidad en los pacientes con trasplante renal, ya que algunos pacientes resultaron casi totalmente metilados (BLT2 y CsA2) y otros mostraron una desmetilación total (BLT3 y CsA1), independientemente del tratamiento inmunosupresor, al ser comparados a los controles, donde casi todas las clonas secuenciadas estuvieron desmetiladas (Figura 20B). Como resultado final, el análisis completo de todos los pacientes muestra un incremento significativo en el porcentaje de metilación de la región FOXP3 TSDR en las Tregs de los pacientes bajo tratamiento con BLT y CsA comparados con el control (Figura 20C). Este incremento de la metilación podría estar asociado con la capacidad supresora reducida observada en la Tregs de los pacientes trasplantados (Figura 17).

A)

```

          150      160      170      180      190      200      210
CD4+CD25hi BLT   TAGTTTTGATTTGTTAGATTTTTTCGTTATTGACGTTATGGCGGTGGGATGCGTTGGGTTTTATCGAT
CD4+CD25hi CsA  TAGTTTTGATTTGTTAGATTTTTTCGTTATTGACGTTATGGCGGTGGGATGCGTTGGGTTTTATCGAT
CD4+CD25hi Control TAGTTTTGATTTGTTAGATTTTTTCGTTATTGACGTTATGGCGGTGGGATGCGTTGGGTTTTATCGAT
Naive T cells   TAGTTTTGATTTGTTAGATTTTTTCGTTATTGACGTTATGGCGGTGGGATGCGTTGGGTTTTATCGAT

```

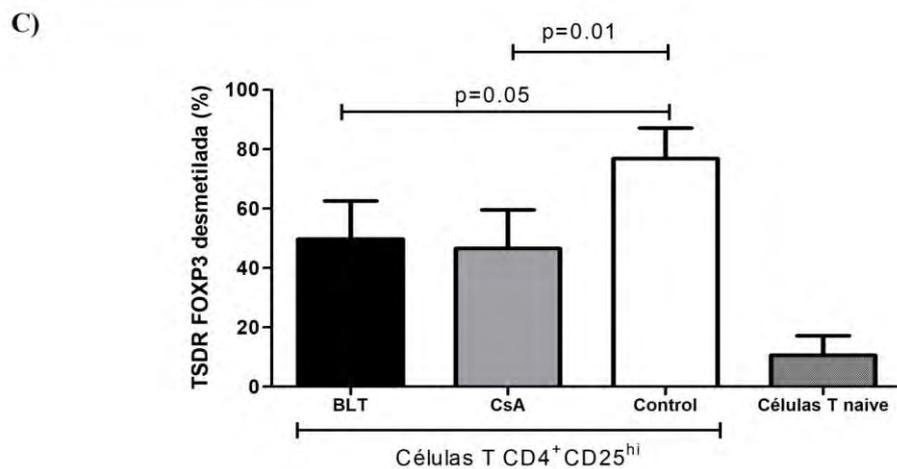
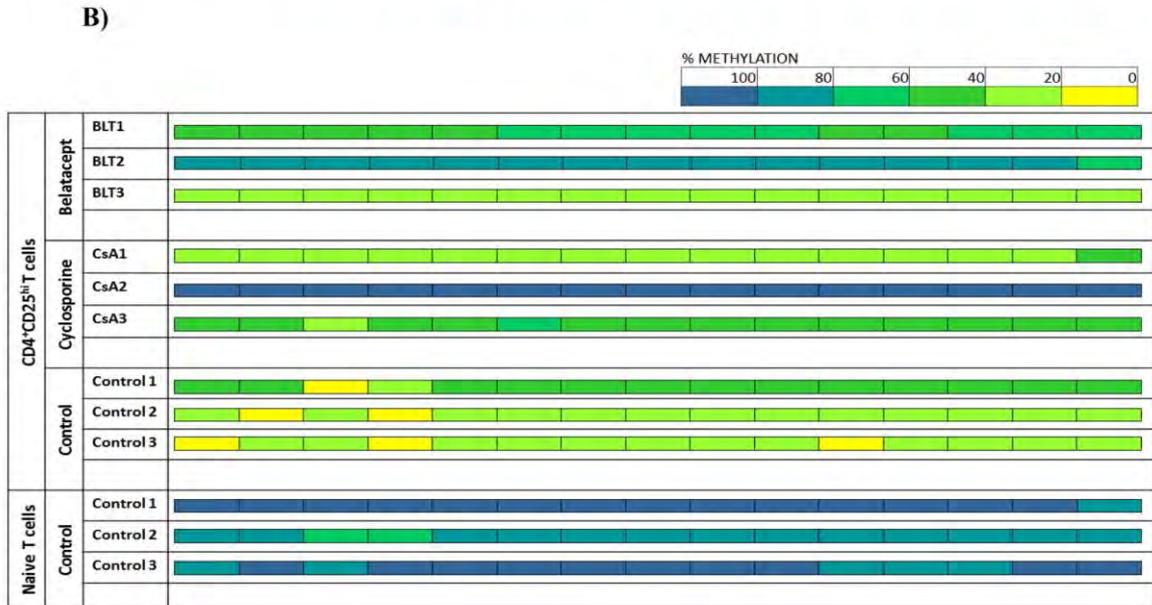


Figura 20. Metilación alterada en la región FOXP3 TSDR de las Tregs provenientes de pacientes trasplantados. Análisis de la secuencias de la región TSDR del gen FOXP3 de individuos con BLT, CsA o control (3 individuos masculinos por grupo, 5 clonas por individuos). (A) Después del tratamiento con bisulfito, todas las citosinas de los sitios CpG (azul) se convierten a timina (rojo); si se encuentran desmetiladas, como se observa en las Tregs de un control. Al contrario, en las células T vírgenes (naïve), cuya región TSDR se encuentra totalmente metilada, todas las secuencias con citosinas no se convierten en timina, por tal motivo es considerado un control negativo del ensayo. Se muestra las secuencias de un representante por cada grupo. (B) El panel muestra el estado de metilación de la región TSDR FOXP3 en las células T indicadas, de los tres grupos evaluados (tres individuos masculinos por grupo). Cada rectángulo representa el análisis de un sitio CpG (15 sitios en total), los datos son presentados como el porcentaje de metilación promedio de 5 clonas por individuo. Los colores

representan el porcentaje de metilación que va de 0% (Amarillo) a 100% (azul) de acuerdo a la escala de colores ubicado en el lado derecho (arriba). (C) Porcentaje de desmetilación de cada grupo evaluado, representado como el promedio entre el número de citosinas desmetiladas y el total de sitios CpG desmetilados dentro de las región TSDR. La altura de cada barra representa la media del conjunto de datos obtenidos por cada grupo. El análisis estadístico se realizó usando la prueba no paramétrica Mann-Whitney, dos colas. BLT, Belatacept; CsA, Ciclosporina A. El grupo control esta conformado de individuos sanos.

1.10 La respuesta alorreactiva en los cultivos mixtos de linfocitos de pacientes trasplantados se encuentra disminuida

Para evaluar si el tratamiento inmunosupresor o el mismo trasplante alogénico a largo plazo puede tener un efecto sobre los linfocitos alorreactivos, se realizaron los cultivos alogénicos entre las células TCD3⁺ del receptor frente a las células del donante como estímulo antigénico. Como se observa en la Figura 21, la proliferación de las células T CD4⁺ (A) y CD8⁺ (B) frente a los antígenos de su donante, se encuentran significativamente disminuida al ser comparada con la los individuos sanos (control). Además, tampoco se observa proliferación frente a células de un tercer donante (no relacionado), excepto en las CD4⁺ de pacientes tratados con Belatacept. Estos resultados podrían indicar que el trasplante a largo plazo puede modificar la respuesta alorreactiva normal observada previo a un trasplante, probablemente por mecanismos de delección clonal, anergia o supresión.

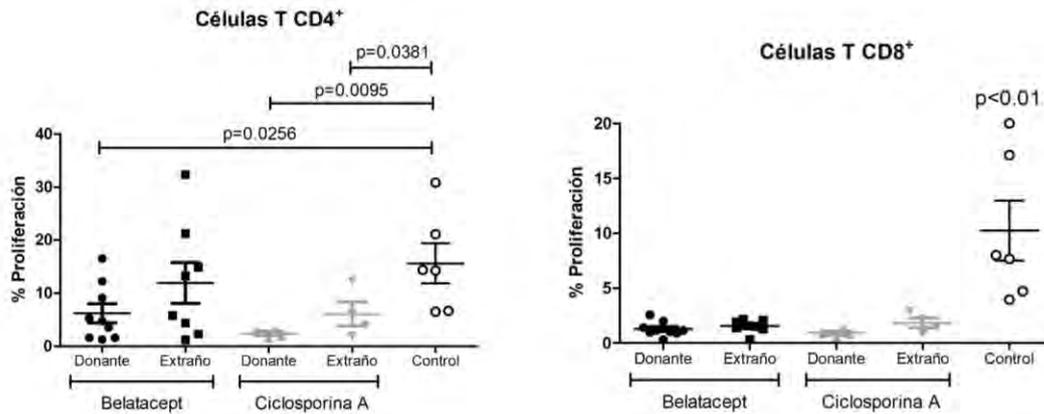


Figura 21. Respuesta alorreactiva reducida en cultivos mixto de linfocitos de pacientes trasplantados. Se realizaron cultivos mixtos entre las células TCD3⁺ marcadas con CFSE de los receptores y las CMSP irradiadas de sus respectivos donantes u otros no relacionados. Al cabo de 5 días, se determinó el porcentaje de proliferación de las células T CD4⁺ y CD8⁺ de los receptores, mediante la dilución del marcador CFSE. Las células T CD4⁺ (izquierda) y CD8⁺ (derecha) de los pacientes trasplantados presentaron una menor proliferación cuando fueron cocultivados con las PBMC de sus respectivos donantes u otros individuos (no relacionado). Los nombres ubicados en la parte superior de cada gráfica de puntos corresponden a la población de donde fue estimado el porcentaje de proliferación. Cada punto indica el valor calculado para cada uno de los individuos que participaron en el estudio. El análisis estadístico se realizó usando la prueba no paramétrica Mann-Whitney, dos colas. BLT, Belatacept; CsA, Ciclosporina A. El grupo control esta conformado de individuos sanos.

2. GENERACION Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS T REGULADORAS ALOESPECÍFICAS INDUCIDAS CON CAPACIDAD SUPRESORA ESTABLE

2.1 Los cultivos de inducción policlonal con rapamicina generan células T reguladoras más estables

Con el fin de generar células T reguladoras policlonales a partir de células T “naïve”, se utilizó rapamicina y ácido retinoico como inductores además del TGF- β -1 para la inducción y mantenimiento de la expresión de FOXP3, como está reportado en la bibliografía. A los 7 días de cultivo, se observó generación de Tregs inducidas en todas las condiciones, siendo significativamente mayor el porcentaje de CD25⁺FOXP3⁺ en la condición de ATRA, comparado con sólo TGF- β -1 (Figura 22, derecha). Sin embargo, cuando se retiraron los estímulos y se dejaron por 4 días con sólo IL-2 (en reposo), sólo las condiciones que contenían rapamicina (+RAPA; +RAPA y ATRA) mantuvieron un porcentaje significativo de la población Treg CD25⁺FOXP3⁺ al compararlo con la condición TGF- β -1 y ATRA (Figura 22, izquierda).

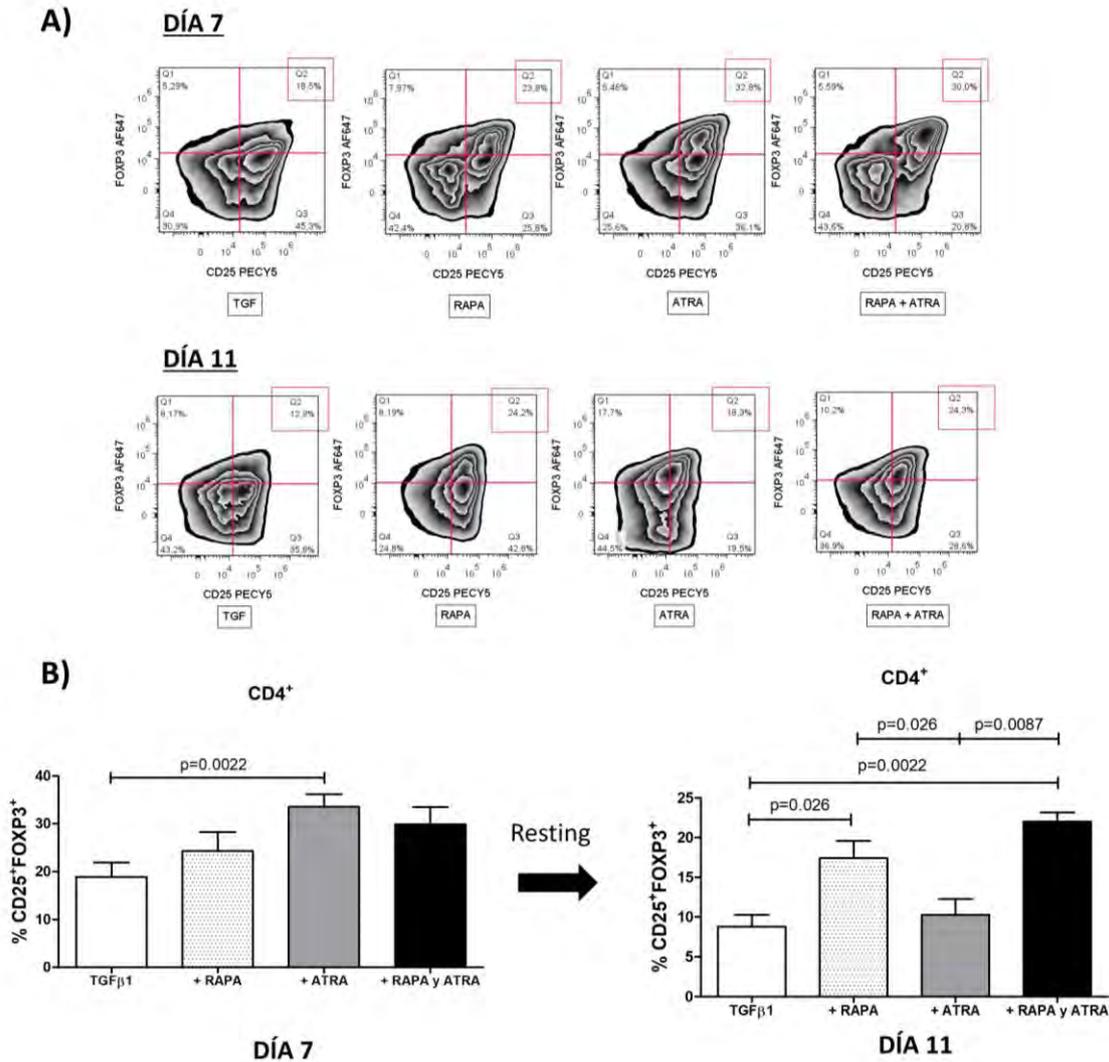


Figura 22. Los cultivos de inducción que contienen rapamicina generan células T reguladoras CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ más estables. Se purificaron células T CD4⁺CD45RA⁺ “naïve” que fueron cultivadas por 7 días en diferentes condiciones. Después de un reposo de 4 días con solo IL-2, se evaluó el fenotipo CD25 y FOXP3 de las células en cultivo. A) Dotplots representativos de cada una de las condiciones señaladas, antes del reposo (día 7) y después del reposo (día 11), donde se puede observar un mantenimiento de las células con fenotipo CD25⁺FOXP3⁺ en las condiciones con rapamicina (B). Los cuadrantes fueron ubicados en base a los controles FMOs para FOXP3 y CD25. La altura de cada barra representa la media del conjunto de datos obtenidos por cada condición evaluada. Los nombres ubicados en la parte superior de cada gráfica de puntos y corresponden a la población de donde fue estimado el porcentaje de células señaladas en la parte izquierda de la gráfica correspondiente. El análisis estadístico se realizó usando la prueba no paramétrica Mann-Whitney, dos colas.

2.2 La expansión de las iTregs policlonales con rapamicina favorece el mantenimiento de su fenotipo

Con el fin de obtener una gran número de las células Tregs generadas para una futura aplicación en la terapia clínica, se separaron de los cultivos de inducción a las células CD25^{HI} (~15%) después de los 4 días de reposo (día 11), ya que esta región contiene a la mayoría de las células FOXP3⁺. Las células separadas provienen de 3 condiciones de inducción: +RAPA, +ATRA y +RAPA y ATRA; y fueron expandidas durante 21 días utilizando el mismo estímulo con las que fueron generadas (Figura 23A). Aunque en la condición con ATRA se observa un mayor número de células, la viabilidad a los 21 días fue menor en comparación con las condiciones que contienen rapamicina (Figura 23B). Además, en estas mismas condiciones se observa un mayor porcentaje de CD25⁺FOXP3⁺ que llega al 80% en la tercera semana de expansión, a diferencia de ATRA que es cerca del 60%; este efecto también se ve reflejado en la expresión de FOXP3, que fue ligeramente incrementado en las condiciones con rapamicina (Figura 23C).

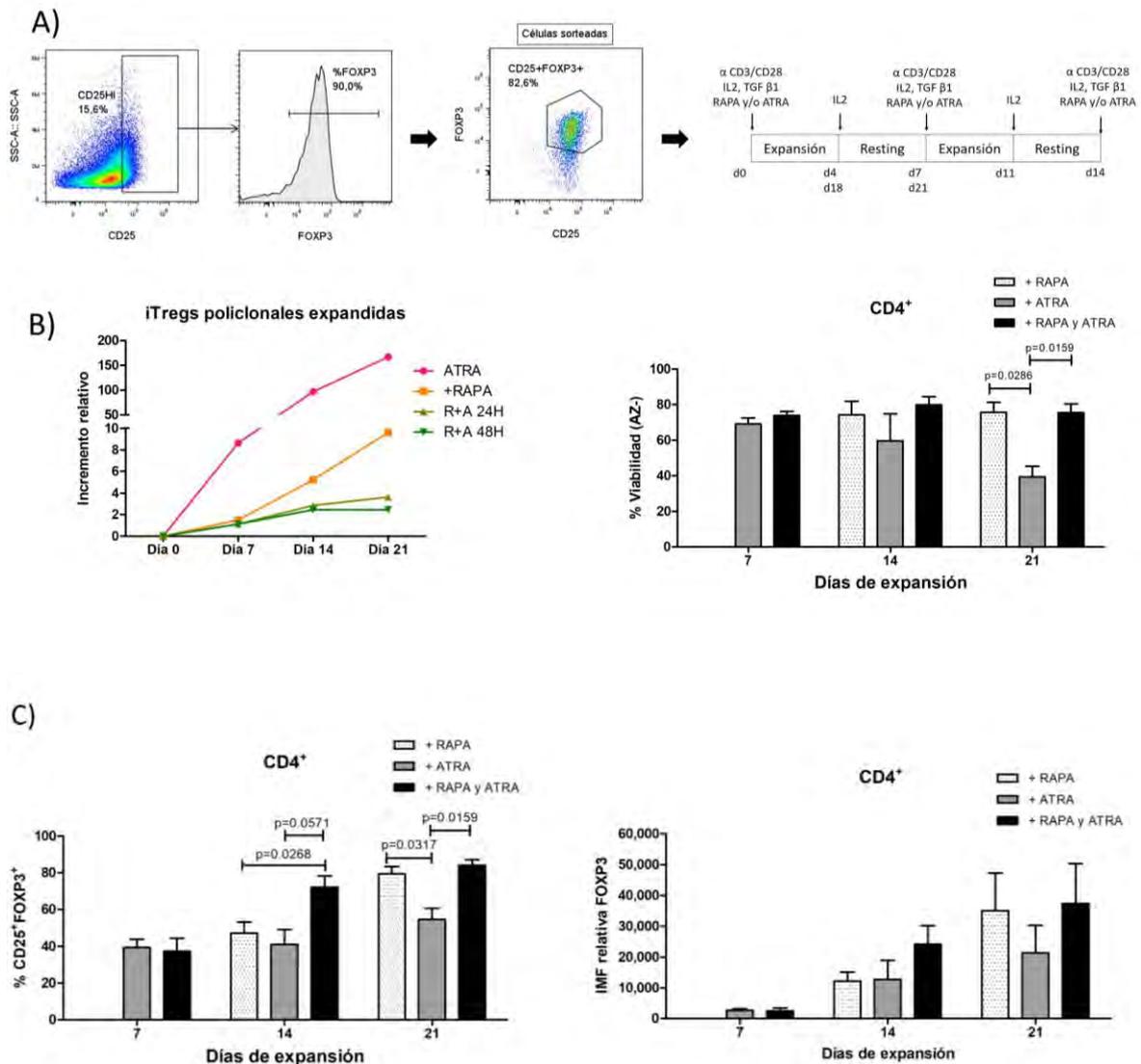


Figura 23. Las iTregs policlonales mantienen su fenotipo al ser expandidas con rapamicina. Se purificaron por “sorting” las células CD25^{hi} de los cultivos de inducción de 11 días (después del reposo). Estas células fueron expandidas durante tres semanas según el esquema señalado (A). Si bien el incremento relativo es superior cuando las células separadas fueron expandidas durante tres semanas con ATRA, su viabilidad es mayor en las condiciones que contienen RAPA (B), así como la frecuencia de CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ y la expresión de FOXP3 (C). Los nombres ubicados en la parte superior de cada gráfica de puntos corresponden a la población de donde fue estimado el porcentaje de células señaladas en la parte izquierda de la gráfica correspondiente. El análisis estadístico se realizó usando la prueba no paramétrica Mann-Whitney, dos colas.

2.3 Las células dendríticas derivadas de monocitos son capaces de inducir una respuesta alogénica

Después de 10 días de cultivo de monocitos en presencia de GM-CSF e IL-4, aparecieron grupos de células no-adherentes, de mayor tamaño, largas y con numerosas proyecciones de su membrana. Los análisis por citometría de flujo revelaron que expresan moléculas de superficie típicas de las células dendríticas al compararlas con los monocitos CD14⁺ (Figura 24A).

Para evaluar que las DC derivadas de monocitos son capaces de inducir una respuesta proliferativa en un MLR alogénico, se estimularon células T con las DC derivadas, en una proporción de 1:4. Nuestros resultados muestran una respuesta proliferativa alogénica significativa de las células T CD4⁺ y CD8⁺ (Figura 24B).

2.4 Los cocultivos de inducción con TGF- β -1 y ATRA generan un mayor número de Tregs con mayor expresión de FOXP3

Para la generación de iTregs alogénicas, se realizaron cocultivos entre las DC derivadas de monocitos y las células T “naïve” en presencia de tres condiciones de inducción: Solo TGF- β -1 (1), TGF- β -1 + ATRA (2) y por último TGF- β -1 + ATRA y RAPA (3). Las tres condiciones generaron iTregs, evidenciado por la presencia de los marcadores de Tregs CD25 y FOXP3, aunque la mayor expresión de FOXP3 se observó en las condiciones (2) y (3), no observándose diferencia entre ellos (Figura 23C, gráfica de barras, derecha). Sin embargo, se evidenció una mayor expansión en la condición (2) a diferencia de la (3), debido al efecto de la RAPA, que es un inhibidor de la proliferación celular (Figura 24C, dotplots, izquierda), por lo que se eligió esta condición (2) para la generación de iTregs aloespecíficas.

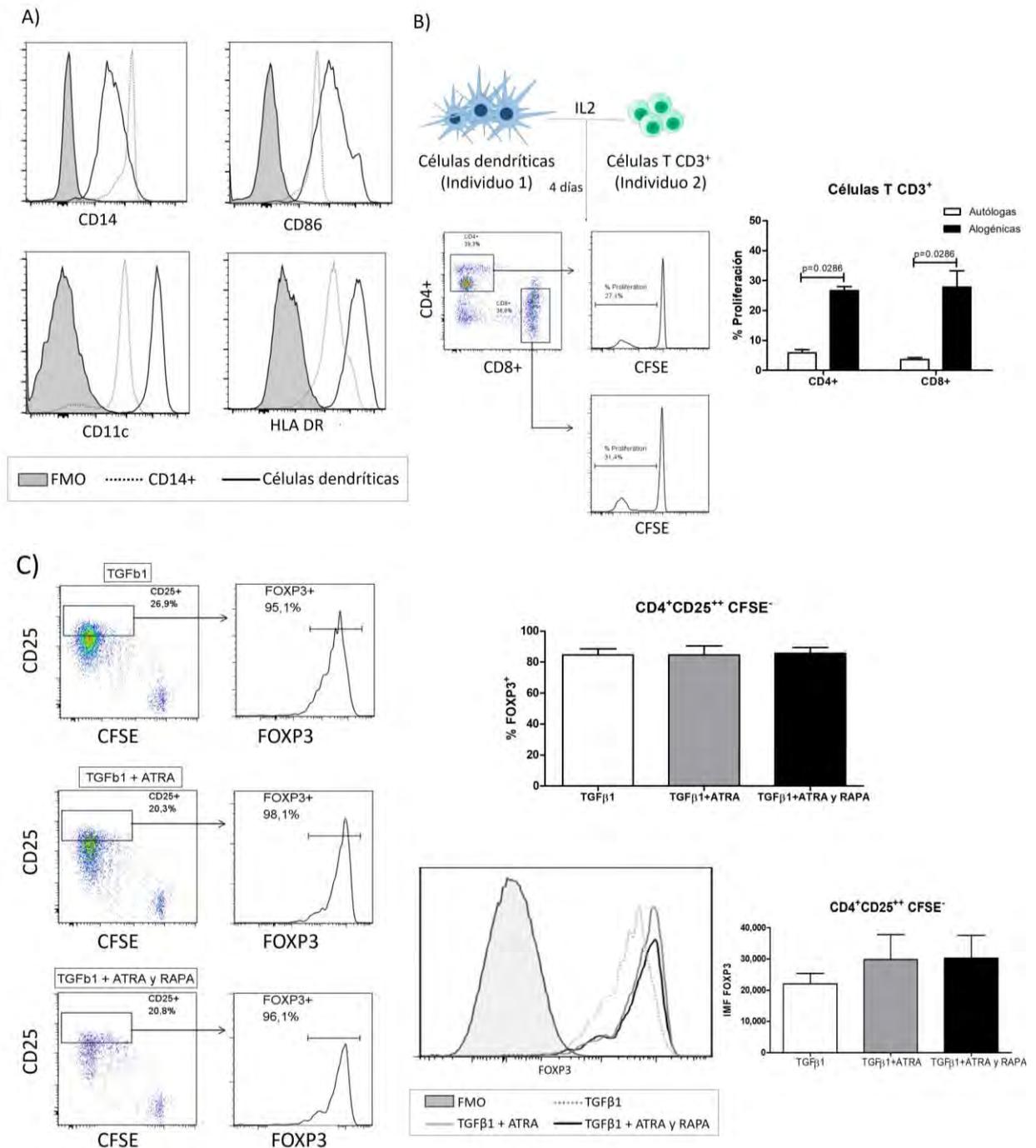


Figura 24. Se derivaron células dendríticas a partir de monocitos, con capacidad de inducir una respuesta alogénica y generar Tregs aloespecíficas. A) Expresión de marcadores representativos de las células dendríticas derivadas de monocitos utilizadas para los ensayos de generación de Tregs aloespecíficas. B) Evaluación de su función como inductor de respuesta alogénica. C) Las DCs derivadas de monocitos fueron capaces de generar células T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ cuando fueron puestas en cocultivos con células T vírgenes, si bien la frecuencia de Tregs es similar en las tres condiciones evaluadas (gráfica de barras, derecha superior), se observa un mayor número de células generadas en las condiciones de TGF-β y ácido retinoico (dotplots de la izquierda). El histograma muestra la expresión de FOXP3 en las diferentes condiciones, que es ligeramente superior en las condiciones con ATRA y/o RAPA

(gráfica de barras, derecha inferior). Los nombres ubicados en la parte superior de cada gráfica de puntos corresponden a la población de donde fue estimado el porcentaje de células señaladas en la parte izquierda de la gráfica correspondiente. El análisis estadístico se realizó usando la prueba no paramétrica Mann-Whitney, dos colas.

2.5 Las células iTregs aloespecíficas expandidas durante 6 semanas mantienen su fenotipo y expresión de CD25 y FOXP3

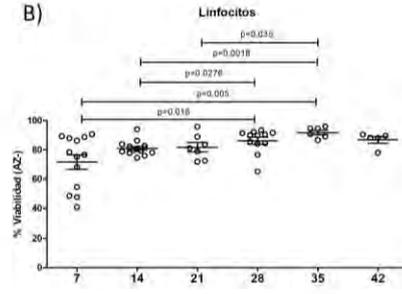
Las células iTregs aloespecíficas generadas con la condición TGF- β 1 + ATRA fueron separadas y expandidas policlonalmente durante 6 semanas, alcanzando durante la 6ta semana de expansión (día 42) un incremento relativo de 232 mil veces el número inicial de células en cultivo (Figura 25A), con una viabilidad celular cercana al 90% evidenciado por tinción con Aqua Zombie (Figura 25B).

Siendo CD25 y FOXP3 marcadores típicos de identificación de las Tregs, se evaluó la frecuencia de la población CD25⁺FOXP3⁺ en los cultivos de expansión. Se observó un incremento de esta población durante todo el cultivo, llegando a su punto más alto en cuarta semana (día 28) de expansión, después de la cual se mantiene su frecuencia (cerca al 90%) (Figura 25C). La expresión de CD25 se incrementó a partir de la segunda semana de cultivo, después del cual no se observaron diferencias notables entre las siguientes semanas. Se observó una mayor expresión de FOXP3 en la cuarta semana (día 28), que fue significativo con respecto a las previas y posteriores semanas de cultivo (Figura 25D). Además, estas células expresan CTLA-4 cuya intensidad aumenta a partir de la segunda semana de expansión (Figura 25E).

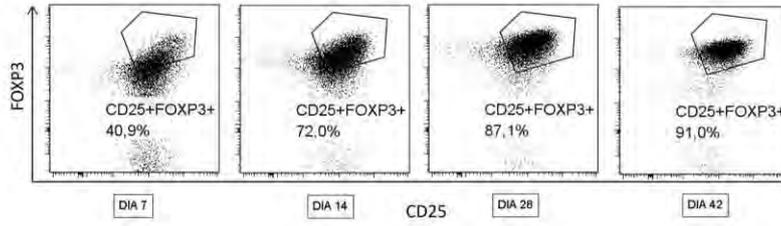
A)



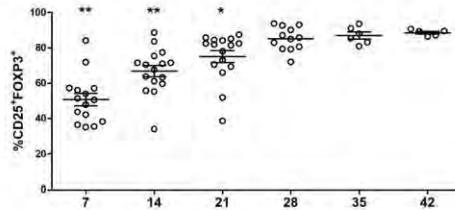
B)



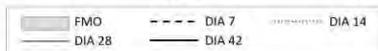
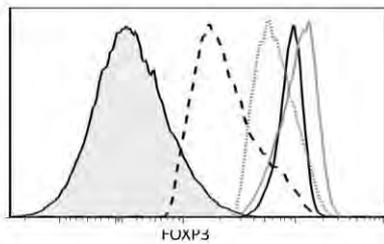
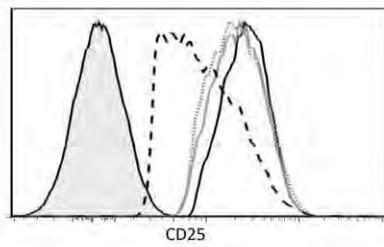
C)



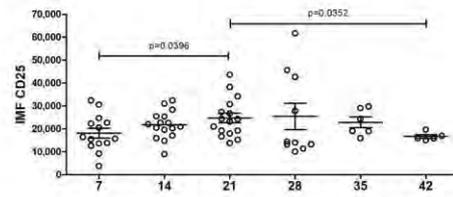
CD4⁺



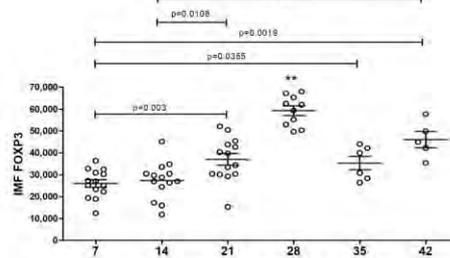
D)



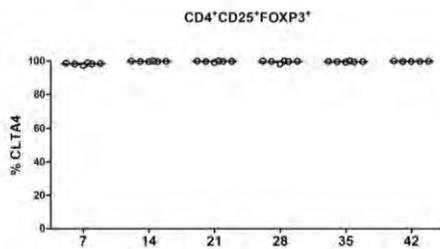
CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺



CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺



E)



CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺

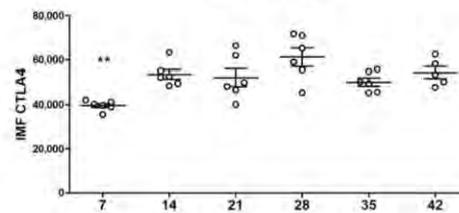


Figura 25. Mantenimiento del fenotipo y expresión de CD25, FOXP3 y CTLA-4 en iTregs aloespecíficas expandidas durante 6 semanas. Las células T CD4⁺CD25⁺CFSE⁻ aloespecíficas aisladas de los cocultivos con las DCs alogénicas fueron expandidas policlonalmente durante 6 semanas, obteniéndose un incremento relativo de 232 mil veces respecto al número inicial (A) y con una viabilidad del 90% (B). Los datos de la figura 25 A, se muestran en escala logarítmica de base 10. C) Dotplots representativos del fenotipo CD25 y FOXP3 de las células expandidas durante 7, 14, 28 y 42 días, la gráfica bajo ellas muestra que la mayoría de ellas fueron CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺. D) Incremento en la expresión de CD25 y FXOP3 de las células expandidas durante 6 semanas. Los histogramas de la izquierda muestran la expresión de CD25 y FOXP3 de las células expandidas durante 7, 14, 28 y 42 días. E) Las células expandidas son del fenotipo CTLA-4⁺ cuya intensidad se incrementa a partir de la segunda semana de expansión. La estrategia de análisis de las células iTregs expandidas se señala en la figura 9 B de la sección Materiales y métodos. Los valores de IMF de cada individuo fueron calculados sustrayendo los valores de IMF del FMO para cada anticuerpo evaluado de su correspondiente población que expresa el anticuerpo señalado. Los nombres ubicados en la parte superior de cada gráfica de puntos corresponden a la población de donde fue estimado el porcentaje de células o valores de IMF señaladas en la parte izquierda de la gráfica correspondiente. Cada punto indica el valor calculado para cada una de las muestras, que provienen de donantes sanos voluntarios. El análisis estadístico se realizó usando la prueba no paramétrica Mann-Whitney, dos colas.

2.6 Las células iTregs aloespecíficas expandidas en presencia de citocinas proinflamatorias no cambian en su frecuencia ni expresión de CD25 y FOXP3

Después de cuatro semanas de expansión, las células iTregs fueron expandidas en presencia de las citocinas proinflamatorias IL-6 y/o TNF- α . No se encontraron diferencias en cuanto a la frecuencia de la población CD25⁺FOXP3⁺ ni en la expresión de CD25, FOXP3 y CTLA-4 al ser expandidas por una (Figura 26A) o dos semanas (Figura 26B) siguientes en presencia de las citocinas señaladas, cuando son comparados con las iTregs controles (sin citocinas proinflamatorias), demostrando la estabilidad fenotípica de las iTregs expandidas.

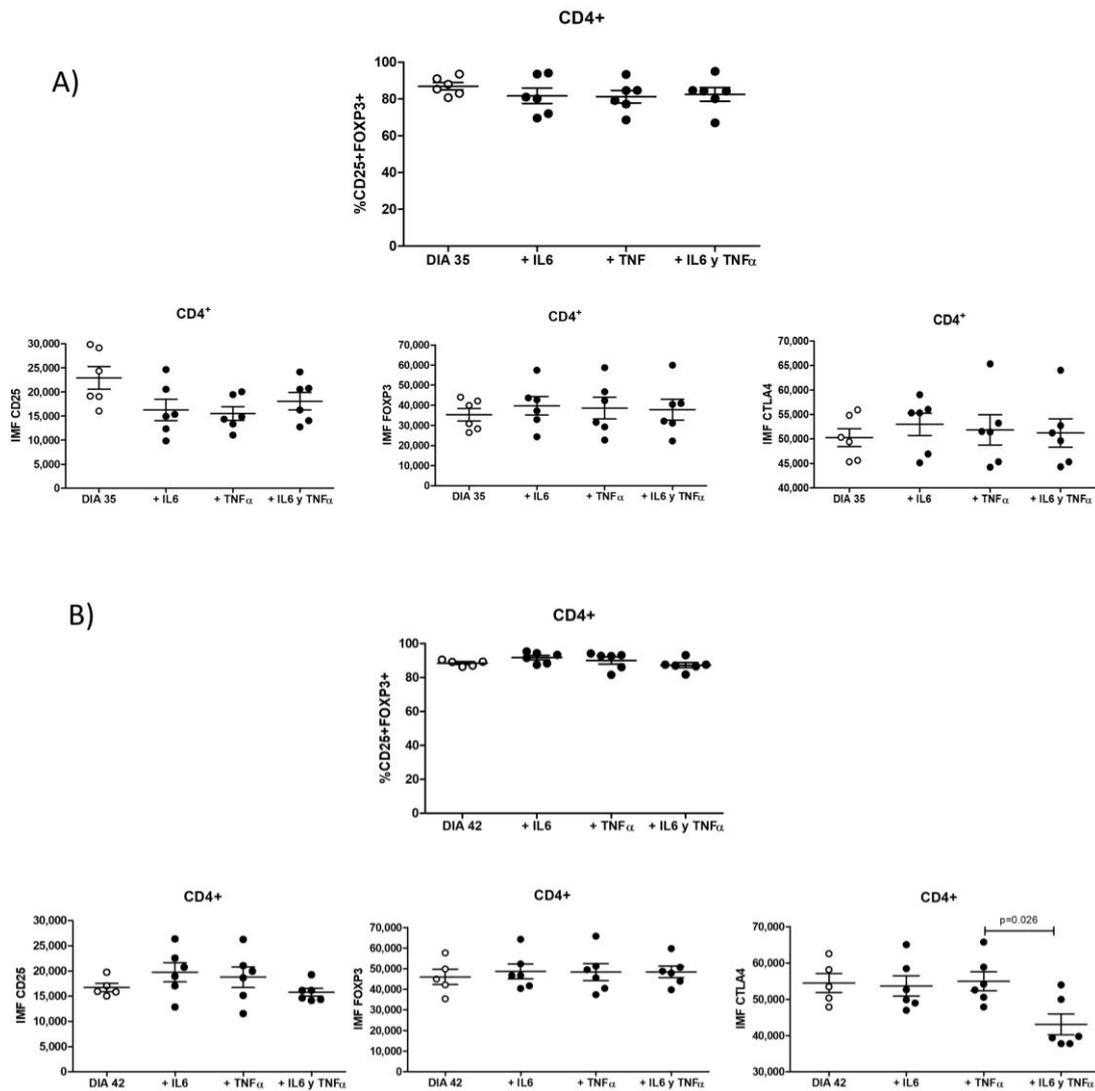


Figura 26. Los cultivos con citocinas proinflamatorias no afecta la frecuencia de CD25⁺FOXP3⁺ y expresión de CD25, FOXP3 y CTLA-4. En la 4ta semana de expansión, las iTregs fueron cultivadas por una semana (A) o dos (B) con las citocinas IL-6 y TNF- α y se evaluó el fenotipo de expresión de marcadores, no encontrándose diferencia con las células expandidas en ausencia de las citocinas mencionadas. La estrategia de análisis de las células iTregs expandidas se señala en la figura 9 B de la sección Materiales y métodos. Los valores de IMF de cada individuo fueron calculados sustrayendo los valores de IMF del FMO para cada anticuerpo evaluado de su correspondiente población que expresa el anticuerpo señalado. Los nombres ubicados en la parte superior de cada gráfica de puntos corresponden a la población de donde fue estimado el porcentaje de células o valores de IMF señaladas en la parte izquierda de la gráfica correspondiente. Cada punto indica el valor calculado para cada una de las muestras, que provienen de donantes sanos voluntarios. El análisis estadístico se realizó usando la prueba no paramétrica Mann-Whitney, dos colas.

2.7 Las células iTregs alo expandidas durante 4 o 6 semanas presentan una supresión aloespecífica que no se ve afectada en presencia de citocinas proinflamatorias

Para evaluar si las iTregs alo expandidas presentan una supresión aloespecífica, se realizaron cultivos mixtos entre las DC como APC, células T CD3 alogénicas y las iTregs aloespecíficas en diferentes proporciones. Se observó que las iTregs alo suprimen de manera aloespecífica la proliferación de las TCD3⁺ (CD4⁺ y CD8⁺) evidenciado por el mayor porcentaje de inhibición, que es más notorio en la proporción de 1:2 (iTregs alo) Esto se corroboró porque estas iTregs no suprimen la proliferación de otras TCD3⁺ alogénicas (3ero); además que las iTregs que al comienzo de los cocultivos no proliferaron frente al DC (iTregs no alo) no suprimen la proliferación de sus respectivos TCD3 alogénicas. Finalmente, la adición de las citocinas IL-6 y TNF- α (Figura 27 A y B) o su expansión por dos semanas con ambas citocinas proinflamatorias (Figura 28 A y B) no alteraron su capacidad de supresión (iTregs alo + IL-6 y TNF- α).

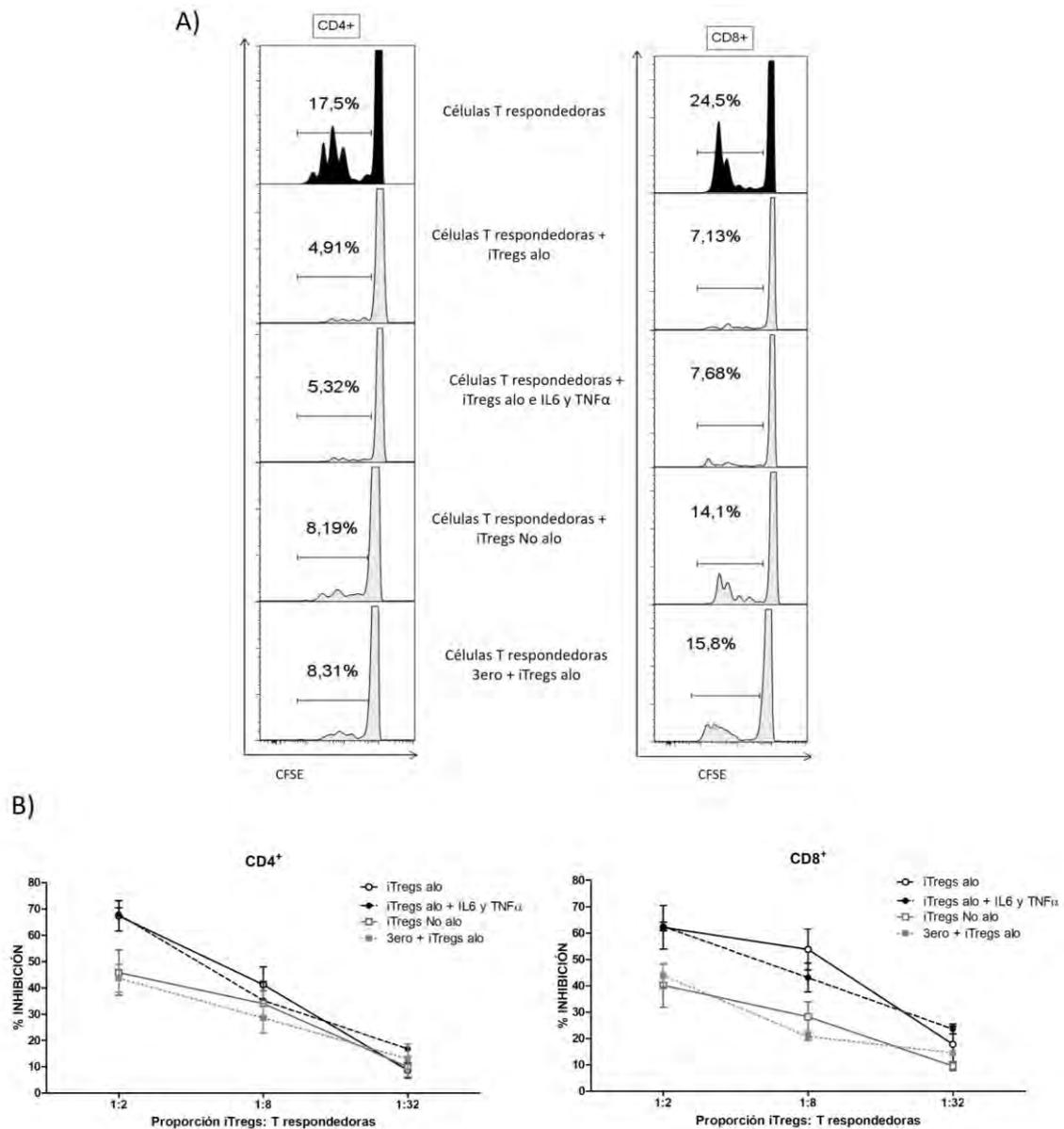


Figura 27. Las células iTregs alo expandidas por 28 días, son específicas al antígeno del donante y no a un tercero y no pierden su función de supresión en presencia de las citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α . (A) Los histogramas muestran la proliferación de las células T CD3⁺ en ausencia (solo células T respondedoras) o presencia de las iTregs expandidas aloespecíficas sin adición de citocinas al cocultivo de supresión (iTregs alo) o con adición de las citocinas IL-6 + TNF- α durante el ensayo (iTregs alo e IL-6 y TNF- α), en la proporción de 1 iTregs: 2 Tresp. Como controles se consideraron unas iTregs no aloespecíficas (iTregs No alo) y unas DCs estimuladoras de otro individuo (3ero + iTregs alo). Los números indican el porcentaje de proliferación. (B) Gráfica que muestra el porcentaje de inhibición de la proliferación de las células T respondedoras (CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺) frente las diferentes condiciones mencionadas y en diferentes proporciones iTregs: T respondedoras. La supresión fue calculada usando la siguiente formula: [(proliferación Tresp sin Tregs - proliferación Tresp con Tregs)/proliferación Tresp sin Tregs] x 100. Cada punto indica la media \pm s.e. promedio de cada condición ensayada.

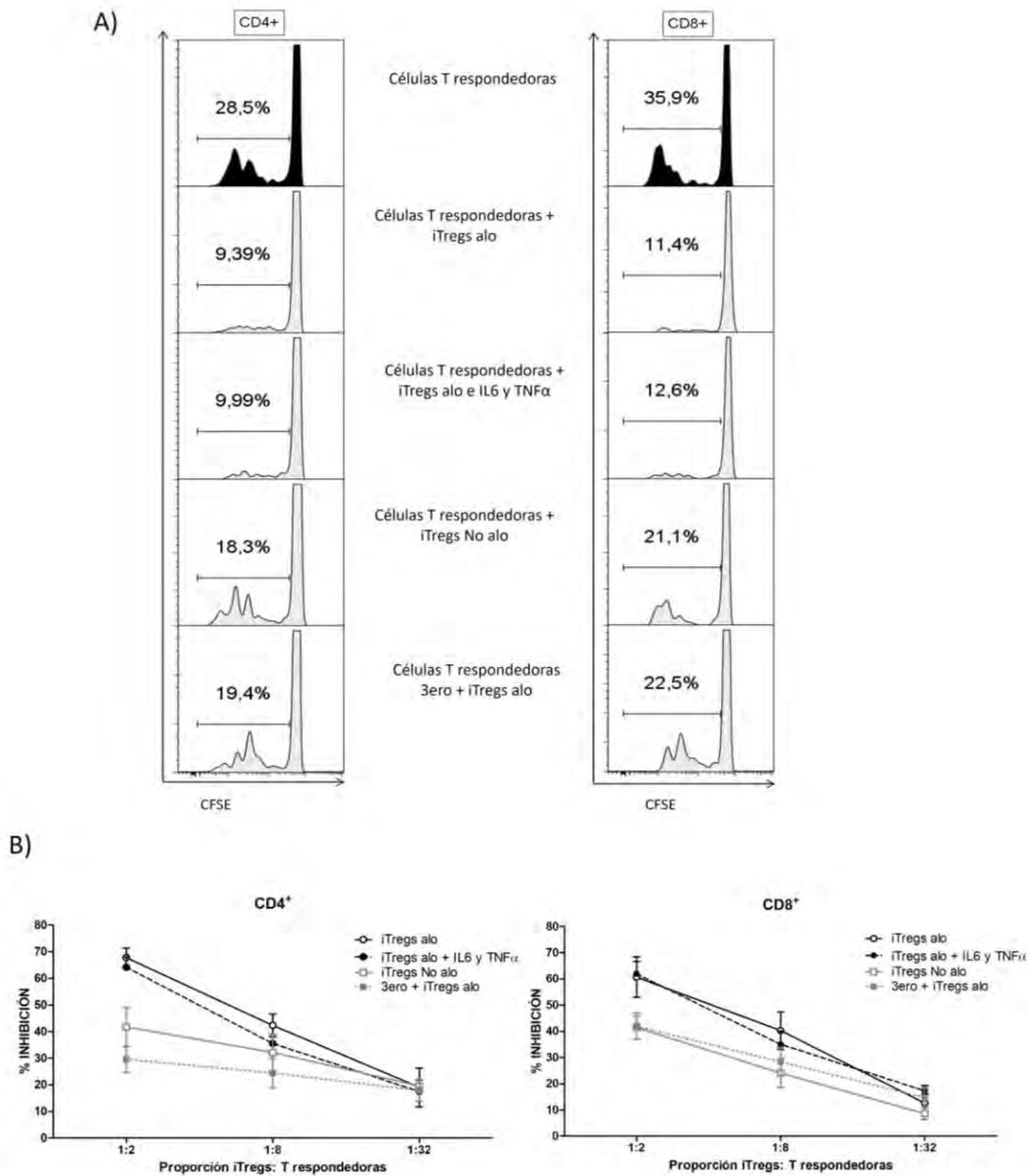


Figura 28. Las células iTregs alo expandidas por 28 días y enfrentadas durante las dos semanas siguientes de expansión a IL-6 y TNF- α , no pierden su función de supresión aloespecífica. (A) Los histogramas muestran la proliferación de las células T CD3⁺ en ausencia (solo células T respondedoras) o presencia de las iTregs expandidas aloespecíficas sin adición de citocinas durante la expansión policlonal (iTregs alo) o con adición de las citocinas IL-6 + TNF- α durante las dos semanas siguientes de expansión (iTregs alo e IL-6 y TNF- α). La proporción de iTregs y Tresp mostrada es de 1: 2. Como controles se consideraron unas iTregs no aloespecíficas (iTregs No alo) y unas DCs estimuladoras de otro individuo (3ero + iTregs alo). Los números indican el porcentaje de proliferación. (B) Gráfica que muestra el porcentaje de inhibición de la proliferación de las células T respondedoras (CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺) frente las diferentes condiciones mencionadas y en diferentes proporciones iTregs: T respondedoras. La supresión fue calculada usando la siguiente formula: [(proliferación Tresp sin Tregs - proliferación Tresp con Tregs)/proliferación Tresp sin Tregs] x 100. Cada punto indica la media \pm s.e. promedio de cada condición ensayada.

2.8 Las células iTregs alo expandidas modulan la producción de citocinas IL-2, IL-10 e IFN- γ para ejercer sus funciones reguladoras

Al medir la producción de citocinas en los sobrenadantes de los cultivos de supresión del día 28 y 42, se observó una reducción de la producción de IL-2, así como un incremento de los niveles de las citocinas IL-10 e IFN- γ al compararlos con los niveles detectados cuando sólo están las células T respondedoras (Figura 29), señalando que las iTregs alo expandidas también ejercen sus funciones supresoras modulando las citocinas del ambiente.

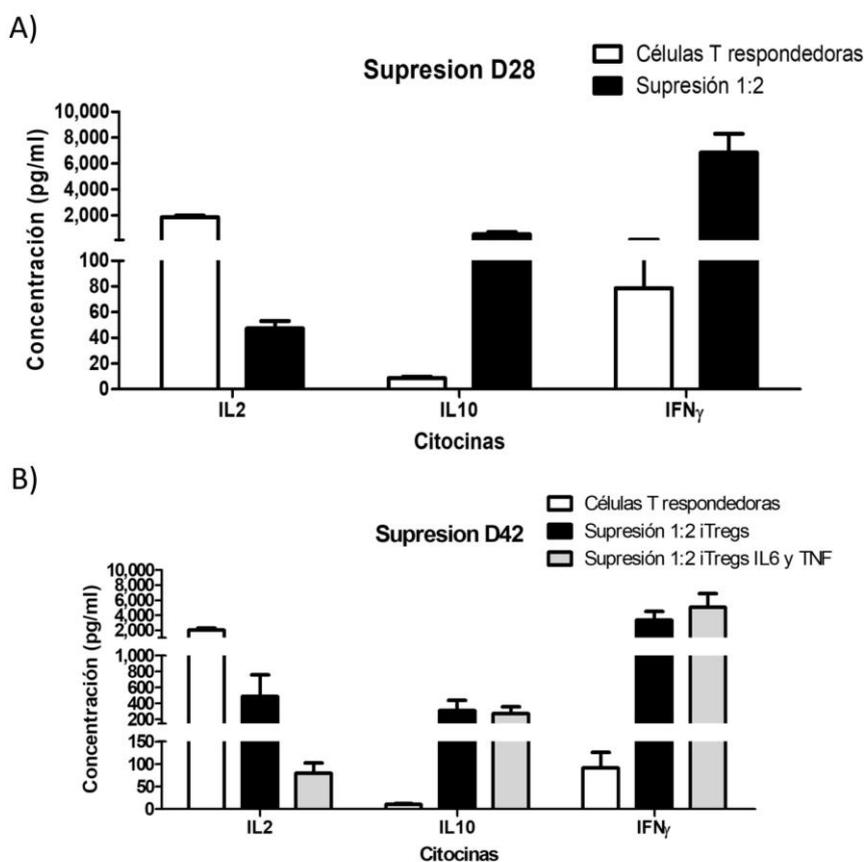


Figura 29. Las células iTregs alo expandidas modulan la producción de IL-2, IL-10 e IFN- γ para ejercer su función supresora. Se midieron las concentraciones de citocinas de los sobrenadantes de los ensayos de supresión de las iTregs expandidas, utilizando el Kit de inmunoensayo basado en perlas (CBA). Las gráficas muestran la producción de citocinas de solo las células T respondedoras (barra blanca), de los cocultivos células T respondedoras y

iTregs alo expandidas durante 4 (A) o 6 (B) semanas (barra negra) y de los cocultivos con las iTregs alo expandidas de 6 semanas con dos semanas previas de expansión con citocinas IL-6 y TNF- α (B) (barra gris). La medición de citocinas en los cocultivos señala una reducción en la producción de IL-2 e incremento en la producción de IL-10 e IFN- γ , cuando las iTregs están presentes con las células T respondedoras. La altura de cada barra representa la media del conjunto de datos obtenidos por cada condición evaluada. El análisis estadístico se realizó usando la prueba no paramétrica Mann-Whitney, dos colas.

2.9 Las células iTregs alo expandidas requieren la presencia de RAPA para mantener su fenotipo y expresión de FOXP3

Para evaluar la estabilidad de la población de iTregs alo expandidas, después de las 6 semanas de expansión, estas células fueron marcadas con CTV y evaluadas su fenotipo y expresión de FOXP3 después de la expansión y reposo, en diferentes condiciones de cultivo. Aunque durante la expansión no se observa una diferencia significativa de frecuencia de CD25⁺FOXP3⁺ entre las cuatro condiciones, se puede observar que la sola ausencia de RAPA, aumenta los ciclos de proliferación, que es más evidente cuando no están presentes ambos TGF- β 1 y RAPA (Figura 30A). Las diferencias son más notorias después del reposo celular, donde la ausencia de ambos inductores disminuye significativamente la población de CD25⁺FOXP3⁺ en los cultivos cuando son comparados con la condición completa (+ TGF- β 1 y RAPA), no siendo muy afectado cuando está presente sólo RAPA (Figura 30B), además de que en esta condición la expresión de FOXP3 es la más cercana a la condición completa (+ TGF- β 1 y RAPA), (Figura 30C). Estos datos señalan que un incremento de la capacidad proliferativa puede llevar a la pérdida del fenotipo Treg, por lo que se requiere de RAPA para mantener esta población a un equilibrio proliferativo adecuado.

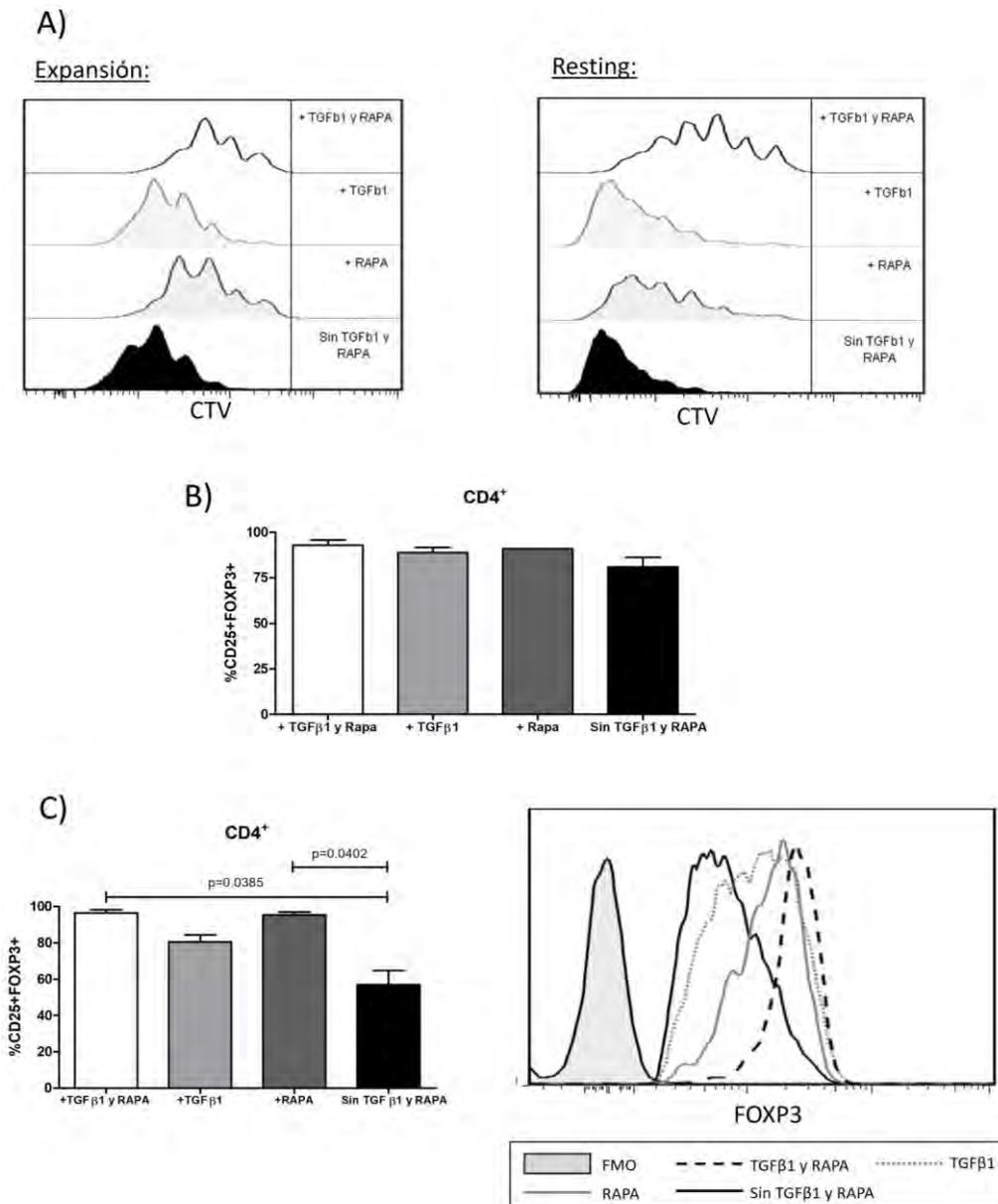


Figura 30. Rapamicina es requerida para mantener el fenotipo y expresión de FOXP3 en la expansión de las células iTregs alo. Las células iTregs alo de 6 semanas de expansión, fueron marcadas con el colorante CTV y se mantuvo en cultivo durante un semana adicional con todas las condiciones de inducción (+ TGF- β y RAPA), con sólo TGF- β (+TGF- β), con solo rapamicina (+ RAPA) o en ausencia de ambos (Sin TGF- β y RAPA). A) Histogramas que muestran los ciclos de proliferación de las células iTregs alo expandidas durante 4 días (gráfica izquierda) o mantenidas en reposo por 3 días (gráfica derecha), donde se observan que aún se requiere de RAPA para controlar la capacidad proliferativa de las iTregs. Cuando se evalúa el fenotipo CD25 y FOXP3 de las iTregs en expansión no se observan diferencias entre las condiciones (B), pero esto se hace evidente cuando las iTregs son puestas en reposo (C), solo manteniéndose el fenotipo y expresión de FOXP3 de las iTregs cuando esta presente rapamicina. Los nombres ubicados en la parte superior de las gráficas de barra corresponden a la población de donde fue estimado el porcentaje de células señaladas en la parte izquierda de la gráfica correspondiente. El análisis estadístico se realizó usando la prueba no paramétrica Mann-Whitney, dos colas.

DISCUSIÓN

El trasplante de órganos es la mejor alternativa terapéutica en pacientes con disfunción orgánica terminal e irreversible. Si bien el empleo de inmunosupresores logró reducir con éxito los episodios de rechazo agudo, su falta de selectividad conlleva a un gran número de efectos adversos responsables del rechazo crónico. Por este motivo el objetivo del trasplante es la inducción de una tolerancia específica con el fin de disminuir el uso crónico de los inmunosupresores. Las células T reguladoras juegan un papel importante en mantenimiento de la tolerancia y también han sido implicadas en la inducción de tolerancia a los órganos trasplantados [220]. Dado su papel fundamental, es importante asegurar que las drogas inmunosupresoras no interfieran en el desarrollo y función de las Tregs [221]. Si bien existen evidencias que sugieren que los inhibidores de calcineurina como la Ciclosporina A (CsA) tendrían un efecto negativo sobre la expansión/ homeostasis de las Tregs y que los inhibidores de la coestimulación como Belatacept (BLT) podría tener un efecto negativo sobre su generación [116], aún no existe todavía mucha información sobre cuál sería su impacto en el mantenimiento y función de las células T reguladoras en el individuo trasplantado.

Muchos estudios han reportado que los pacientes trasplantados y bajo el tratamiento con BLT, muestran una mejor función renal y una menor nefropatía crónica en comparación a los pacientes bajo tratamiento con CsA [43, 126, 222]. Algunos reportan que las frecuencias de las Tregs en sangre periférica e injerto renal se encuentra incrementado en pacientes con BLT [129, 223], aunque otros estudios señalan lo contrario [132]. Estas diferencias pueden ser debidas a los parámetros que se usaron para la caracterización de las células T reguladoras, como son los marcadores empleados para su identificación, diferentes estrategias de “gating” o el número reducido de participantes reclutados, además de las diferencias en el tiempo que llevan

trasplantados. En el presente estudio, no se encontraron diferencias en la frecuencia de Tregs ($CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo/-}FOXP3^+$) entre los pacientes bajo tratamiento con BLT y CsA (Figura 12B), aunque ambos grupos fueron significativamente más bajos que los individuos sanos. Es importante señalar que para la identificación de las Tregs se emplearon como marcadores además de CD25 y FOXP3, la baja expresión de CD127 y es el resultado de un promedio de 35 pacientes que llevan más de 7 años de trasplante con función renal estable. Por el contrario, los otros estudios reportados analizaron las Tregs en base a la expresión de CD25 y FOXP3 [129], dos marcadores que son expresados transitoriamente en células T humanas activadas [224], o con datos limitados por el número de pacientes reclutados [223].

Los pacientes con BLT mostraron una mayor frecuencia de células T $CD4^+$ vírgenes (Figura 10B), esto puede deberse a que esta droga bloquea las señales coestimuladoras requeridas para que las células T vírgenes se diferencien en fenotipo efector y de memoria, dando como resultado su acumulación en la periferia. Esta detención de la maduración puede ser crítico para el mantenimiento del efecto anti-rechazo del órgano. Previo a las señales clínicas de disfunción renal, se puede considerar los cambios hacia el fenotipo de memoria como un presagio a un posible rechazo. Pese a esto, algunos estudios han reportado una alta incidencia de rechazo agudo en pacientes con Belatacept en comparación con Ciclosporina [222], esto se debería a que a diferencia de las células T vírgenes, las células T de memoria pre-existentes del paciente no serían afectados por Belatacept. Las células T de memoria son una barrera para los bloqueadores de la coestimulación como Belatacept, ya que estas células ejercen su función sin depender de una total señal coestimuladora [225]. Pero éstas son sensibles a los efectos de los inhibidores de la Calcineurina como CsA, ya que las señales blancos del CNI son requeridas por las células T vírgenes y de memoria.

En este trabajo, los pacientes trasplantados, independientemente del inmunosupresor, presentaron menor frecuencia de células T $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$ $FOXP3^+$ (Tregs) con respecto a los individuos sanos. La manera como estaría actuando Belatacept, inhibidor de la coestimulación, sería bloqueando la señalización a través de CD28 y CTLA-4. La supervivencia de las Tregs tímicas es estrictamente dependiente de la señal CD28, ya que la vía coestimuladora CD28/B7 es esencial para el desarrollo y homeostasis de células T reguladoras que controlan las enfermedades autoinmune [124]. Con respecto a CTLA-4, un trabajo reportó que si se incrementaba la señal de esta molécula, había mayor generación de Tregs, que durante o después de la activación de las células T, donde el CTLA-4 no sólo suprimiría su proliferación sino causaría un incremento de IL-10 y TGF- β , además de la reducción de IL-2 e IFN- γ , creando un microambiente propicio para la generación de Tregs [226]. Otro trabajo reportó que se requiere del CTLA-4 para la generación mediada por TGF- β de Tregs periféricas, ya que observaron que no se pudo inducir Tregs a partir de células $CD4^+CD25^-$ KO para CTLA-4 en presencia de TGF- β ; esto es porque el TGF- β acelera la expresión de CTLA-4 en las células $CD4^+CD25^-$ y por ende su interacción con el CD80/86 de las APCs, convirtiendo las señales fuertes y estables de activación a señales que favorecen la anergia, de ese modo facilitando al TGF- β la expresión de FOXP3 en las células $CD4^+CD25^-$ y el desarrollo de su actividad supresora [227]; por lo que la señalización del CTLA-4 sería importante para la inducción de Tregs en periferia. El efecto de CsA sobre el desarrollo de Tregs puede ser explicado por diferentes mecanismos como la reducción de la cooperación entre el NFAT y el factor de transcripción FOXP3, bloqueo de la secreción de IL-2 e interferencia con la vía de señalización de la IL-2, mediada por miR155 [118, 228]. Estudios previos señalaron que se requieren de ambas señales (CD28 e IL-2) para la expresión sostenida de FOXP3 en las Tregs y el mantenimiento de su

fenotipo estable en la periferia [229, 230]. En este estudio, los pacientes trasplantados de ambos grupos mostraron una reducción significativa de la expresión de FOXP3 el cual podría estar asociado con una baja función supresora *in vitro* (Figura 12C).

Miyara *et al*, identificó tres poblaciones únicas y funcionales de FOXP3 dentro de las células TCD4⁺ periféricas: CD25⁺CD45⁺FOXP3^{lo}, CD25^{hi}CD45RA⁻FOXP3^{hi} y CD25⁺CD45RA⁻FOXP3^{lo}, donde las dos primeras presentan funciones supresoras *in vitro* y las denominó Tregs “naïve” /en reposo y efectoras/activadas, al contrario de la última población de producen citocinas proinflamatorias [231]; otro trabajo señaló que las Tregs CD45RO⁺ son más proliferativas que las Tregs CD45RA⁺ y ambas tienen diferentes patrones de migración [232]. Cuando nosotros analizamos la expresión de FOXP3 en las Tregs de los individuos sanos, encontramos que las Tregs vírgenes presentan menores niveles de este marcador, y debido a que hay un incremento de Tregs vírgenes en los pacientes bajo tratamiento con BLT, se investigó si la disminución de FOXP3 en el “pool” total de Tregs es debido a este incremento. Según los datos, una acumulación de Tregs “naïve” no pueden justificar la expresión reducida de FOXP3 dentro de pacientes tratados con BLT, ya que este factor de transcripción se encuentra reducido no sólo en las Tregs “naïve” (CD45RA⁺) sino también en las activadas (CD45RA⁻) (Figura 14). Estos datos sugieren, que la menor expresión de FOXP3 no es debida a diferencias en la composición del “pool” total de Tregs.

Helios fue inicialmente reportado como un marcador de Tregs generadas en el timo y fue utilizado para diferenciar las tTregs de aquellas generadas en la periferia [95]. Sin embargo, algunos reportes señalan que Helios pueden también ser expresado en las Tregs inducidas en la periferia, además de estar asociado con la activación de las células T y división celular [97]. Se reportó que las Tregs FOXP3⁺Helios⁺ representan una población más estable, proliferan más y tienen una mejor función supresora, y se

diferencian de las Tregs FOXP3⁺Helios⁻ en su estatus epigenético del locus FOXP3 y en su capacidad de producir citocinas efectoras como IL-2 e IFN- γ [233, 234]. Si evaluamos la expresión de FOXP3 dentro de la población Tregs Helios⁺, para ser más estrictos en su identificación, de igual manera se ve una disminución de su expresión en ambos grupos trasplantados al compararlos con el control (Figura 15), por lo que la disminución de la expresión de FOXP3 es independiente de la expresión de Helios.

En un modelo murino de trasplante de córnea donde evaluaron la cinética y función de las Tregs entre los que aceptaron y rechazaron el injerto, observaron que aunque no había diferencia en la frecuencia de sus Tregs, si los hubo en sus niveles de expresión de FOXP3; las Tregs de los que aceptaron el injerto expresaban mayores niveles de FOXP3 y eran más efectivas en suprimir la proliferación de células T vírgenes y producir altos niveles de TGF- β e IL-10, al compararlos con el segundo grupo [235]. Esto indicaría que los niveles de expresión de FOXP3 están directamente asociados con su potencial regulador. Debido a que la capacidad supresora de las células T reguladoras está relacionada a la expresión de FOXP3, un factor de transcripción que modula la expresión de genes implicados en la regulación inmune como CD25, CTLA-4 y GITR [236], la baja expresión de este factor de transcripción explicaría la función supresora reducida de las Tregs de los pacientes trasplantados observada en los ensayos *in vitro* (Figura 17). Un trabajo previo señaló que la función supresora de las Tregs de pacientes con BLT o CsA no se encuentra disminuida, sin embargo dichos estudios utilizaron como células T respondedoras las de sus respectivos donantes, justificando que probablemente la proliferación de las células T de los pacientes se encontraría afectada por el tratamiento inmunosupresor [131]. En el presente trabajo se utilizaron las células T respondedoras de los pacientes, que sería el escenario más cercano como funcionarían las Tregs, es decir una supresión autóloga hacia sus células T alorreactivas. Además, no

se observaron diferencias de proliferación entre las células T respondedoras de los diferentes grupos evaluados (Figura 18), descartándose la posibilidad de la falta de proliferación por causas intrínsecas de la célula debido a las drogas inmunosupresoras.

Otra de las funciones supresoras de las Tregs afecta la producción de citocinas como IFN- γ e IL-2; se ha descrito que en la primera es inhibiendo su producción por parte de las células T respondedoras y la segunda “consumiendo” la IL-2 a través de su alta expresión de CD25, que forma parte del receptor para IL-2. Por este motivo se evaluaron los niveles de ambas citocinas en los ensayos de supresión en presencia o ausencia de Tregs. Aunque las Tregs de ambos grupos tratados (BLT y CsA) no fueron capaces de suprimir la proliferación de las células T respondedoras, sí lograron suprimir la producción de IFN- γ (Figura 19A). La supresión por parte de las Tregs se da en diferentes mecanismos: proliferación, función efectora y diferenciación. El mecanismo utilizado por las Treg depende de su estado de activación. Se ha reportado que la supresión de la señalización del TCR, transcripción de IL-2 e IFN- γ así como producción de IFN- γ es retenido en las T convencionales después de la remoción de las Tregs en los cocultivos [86], además de que la supresión mediada por Tregs de la producción de IFN- γ por CD4 T cells puede ocurrir sin suprimir la proliferación [237]. Por ello, se plantea que la supresión de la proliferación en células convencionales requiere de contacto celular más prolongado y puede ser dependiente de CTLA-4 y el consumo de IL-2 [238]. Los resultados muestran que aunque las células Tregs de los pacientes son capaces de suprimir la producción de IFN- γ , probablemente la falta o reducción de moléculas de membrana que facilitarían un contacto prolongado, sumado a la baja expresión de CD25, podrían conllevar una inhibición en la proliferación de las células T respondedoras. Evidentemente, las Tregs de pacientes bajo tratamiento con Belatacept no fueron capaces de “consumir” la producción de IL-2 (Figura 19B). La

menor producción de IL-2 por las células T respondedoras observada en pacientes con Ciclosporina, se correlaciona con la función de esta droga de inhibir las vías de dependientes de Calcineurina, como sería la transcripción de genes que codifican para citocinas como IL-2. Además, esta menor producción de IL-2 coincide con una menor proliferación observada de sus T respondedoras al ser activadas mediante perlas CD3/CD28 (Figura 18).

Muchos reportes han señalado la “división de labores” entre las distintas subpoblaciones de Tregs en el mantenimiento de la tolerancia [57]. En el contexto de una tolerancia aloespecífica, se sostiene que las tTregs podrían participar en la inhibición del tráfico de las células T efectoras al órgano blanco mientras que las iTregs antígeno-específico participarían principalmente en evitar el “priming” de las células T al actuar sobre las células dendríticas [239]. Por este motivo, sería importante analizar el impacto de los inmunosupresores en el porcentaje y función de ambas subpoblaciones. En este estudio, se observó una disminución en el porcentaje y función supresora de las células Tregs circulantes, sin embargo aún no existen marcadores específicos que puedan de manera confiable distinguir ambas subpoblaciones de Tregs tímicas y periféricas [97].

En receptores de trasplante de hígado se reportó que el número de células T que reconocen de manera directa los antígenos del donante aumenta de manera significativa una semana después del trasplante, para luego disminuir gradualmente durante el primer año hasta valores más bajos que los reportados en el pre-trasplante [240]. Otro trabajo reportó que las células TCD4⁺ de pacientes con trasplante renal por 13 años, presentaron una disminución en la proliferación y secreción de citocinas IL-2, IL-5 e IFN- γ cuando eran activados por la vía directa, independientemente si eran pacientes estables o en proceso de rechazo, ellos atribuyen el fenómeno a la anergia, dado que la alorrespuesta

se recupera en presencia de IL-2, aunque no descartan la delección de la células T alorreactivas. Sin embargo, encontraron un incremento en la frecuencia de células TCD4⁺ activadas por vía indirecta en pacientes en proceso de rechazo crónico, lo que sugiere su participación en el desarrollo de este fenómeno [241]. Aunque los pacientes que integran el presente estudio ya tienen muchos años trasplantados, es importante conocer la respuesta alorreactiva de sus células T, debido al efecto distinto que tienen los inmunosupresores BLT y CsA sobre las células T de memoria. No se encontraron diferencias en el porcentaje de células T CD4⁺ y TCD8⁺ que proliferan frente a los antígenos de su donante (Figura 21), además que esta respuesta alorreactiva obtenida por vía directa fue reducida en comparación a los individuos no trasplantados (10 - 15%). Es probable que la ausencia de alorrespuesta directa se deba al fenómeno de hipo-respuesta atribuido a la delección clonal, anergia o supresión ejercida por células reguladoras. Según modelos murinos, la presentación de aloantígenos por células parenquimales del injerto resulta en anergia de las células T alorreactivas [242], que puede ser revertida mediante incubación con IL-2 [243]. Sin embargo, en nuestro estudio esto último se tendría que descartar ya que no proliferaron en presencia de IL-2, por lo que es posible que la ausencia de alorrespuesta directa sea de algún modo por delección clonal, además que trabajos en modelos murinos sugieren que la inducción de tolerancia es dependiente de una reducción del repertorio alorreactivo por muerte celular inducida por activación, a unos niveles que sean controlables por mecanismos regulatorios [244, 245]. Por otra parte, se ha reportado que en pacientes que llevan mucho tiempo con trasplante de órgano como las incluidas en este estudio, las células T alorreactivas presentes son aquellas que reconocen a los aloantígenos de manera indirecta [27], y por este motivo se debe considerar evaluar la supresión de las Tregs sobre células T alorreactivas activadas por esta vía. Por lo tanto, no se excluye la

posibilidad que las Tregs con aloespecificidad a la vía indirecta pueden tener una normal función supresora. Además no se puede descartar que la población de Tregs aloespecífica relevante haya migrado al órgano trasplantado para ejercer su función y ya no se encuentra en sangre periférica, como se reportó en otros trabajos [127]. Estos datos serán de gran utilidad para saber que células T alorreactivas se quiera suprimir en una futura terapia clínica con células T reguladoras.

Además de que las drogas inmunosupresoras puedan afectar la generación y/o homeostasis de la población de Tregs, es probable que la reducción en su frecuencia y expresión de FOXP3 sea causado por un efecto de las drogas sobre la estabilidad de FOXP3, que es controlado por modificaciones epigenéticas y pos-transduccionales [246, 247]. En este sentido, la expresión estable de FOXP3 es dependiente de la desmetilación de la región TSDR dentro del locus FOXP3. La desmetilación del TSDR toma lugar en estadios tempranos del desarrollo de las Tregs en el timo, en precursores Tregs después que la proteína FOXP3 es detectable, y en paralelo con el establecimiento del perfil de expresión génica específica de las Tregs. Este fenómeno forma parte de su programa de maduración que es completada cuando las Tregs egresan a la periferia. Las enzimas TET están implicadas en su desmetilación, por lo que es un mecanismo activo, independiente de mitosis, y muchas señales estarían implicadas en la activación de las enzimas TET [248]. A diferencia de otros estudios en que analizaron el estado de metilación de la región TSDR en el pool de PBMC y por PCR en tiempo real [249], en el presente estudio se secuenció la región TSDR de las células Tregs aisladas y de esa manera obtener una información más fidedigna sobre el estatus epigenético de la región TSDR del gen FOXP3. De manera interesante, nuestros datos señalaron que los pacientes trasplantados bajo tratamiento con BLT o CsA presentan una metilación parcial en la isla CpG de la región TSDR (Figura 20), el cual estaría relacionado a su

función supresora reducida de las Tregs de estos pacientes. Por lo que la pérdida de desmetilación en la región TSDR puede ser responsable de la expresión reducida de FOXP3 observada en estos pacientes y los bajos niveles de marcadores dependientes de FOXP3 como CD25 y CTLA-4 [118, 250], dado que la sobre-regulación de estos marcadores está asociado con un incremento de la actividad de las Tregs [230, 251].

El incremento de metilación en la región TSDR en los pacientes trasplantado puede deberse al bloqueo de las vías de señalización debido al empleo de las drogas inmunosupresoras. Belatacept impide la señalización a través del CD28 y Ciclosporina de las vías de las calcineurinas, ambas drogas bloquearían o impedirían las señales recibidas a través del TCR. Se ha reportado que las enzimas TET podrían participar en la desmetilación de FOXP3 [248]. La enzima Ten-eleven translocation (TET) cataliza la conversión de 5-metilcitosina (5mC) a 5-hidroximetilcitosina, que es un intermediario en el proceso de desmetilación del DNA. Una alta expresión de estas enzimas fue observada en el subtipo de Tregs tímicas y la delección de las enzimas TET resulta en la hipermetilación del FOXP3 [252], además que la señalización a través del TCR conduce a una sobre-expresión de las enzimas TET que es requerida para la estabilidad de FOXP3, e IL-2 es fundamental para mantener su alta expresión [253]. Otros señalan que el SMAD3 dependiente de TGF- β y STAT5 dependiente de IL-2, facilitarían la unión de TET1 y TET2 al gen FOXP3 [252]. La vía de CD28 también está implicada en las modificaciones epigenéticas, ya que es capaz de activar enzimas acetiltransferasas, modificadores de nucleosomas, facilitando el remodelamiento de la cromatina, como el locus para IL-2, donde se reportó cambios epigenéticos como acetilación de histonas y desmetilación de citocinas en la región promotora/enhancer del gen, sólo cuando la activación se realiza en presencia de la costimulación del CD28 [254], además que la señalización a través del CD28 en las Tregs es requerida para la estabilización de

mRNA FOXP3 en los Tregs tímicos precursores [255]. Por lo tanto el bloqueo de estas vías por las drogas inmunosupresoras pueden explicar la metilación de la región TSDR del gen FOXP3 observada en ambos grupos de pacientes trasplantados. Aunque nuestros resultados sugieren un impacto de las drogas BLT y CsA sobre la metilación de la región TSDR, no se puede descartar la alteración en la función supresora de sus Tregs a factores independientes de FOXP3 como son IL-10, TGF- β , Granzima B y Galectina-1 que podrían estar afectadas [256]; o a defectos en la señalización de IL-2 lo cual también pueden contribuir a la disminución de la expresión de FOXP3, que se observó en pacientes con diabetes tipo 1, que presentaron una disminución en la fosforilación de STAT5 e incremento de la expresión de la fosfatasa PTPN2 lo cual podría explicar la falta de mantenimiento de la expresión de FOXP3 de sus Tregs [257], por lo que es necesario incluir otros estudios fenotípicos y funcionales para determinar el mecanismo implicado en las alteraciones fenotípicas y funcionales observadas en las Tregs de estos pacientes que llevan mucho tiempo trasplantados.

Estos resultados también señalan que las Tregs no son las únicas poblaciones celulares responsables de estado inmune quiescente conseguido en los pacientes trasplantados por mucho tiempo y clínicamente estables. Un estudio reciente mostró que los pacientes bajo tratamiento con BLT presentan un incremento de poblaciones con funciones reguladoras como las células B IL-10⁺ e IDO [129, 258], los cuales pueden promover la tolerancia durante el trasplante y facilitar la supervivencia y función del aloinjerto.

Dado que las células T reguladoras no solo participan en el mantenimiento de la tolerancia a antígenos propios y regulación de la respuesta inmune contra antígenos extraños, sino también limitando la respuesta alorreactiva, es necesario el desarrollo de un amplio número de estrategias que permiten su generación y/o expansión *in vitro* y así

obtener una cantidad suficiente de ellas que puedan controlar el número de células T alorreactivas presentes en el receptor, promoviendo una tolerancia donante-específico y reduciendo o evitando los efectos adversos de los inmunosupresores.

Estudios en modelos murinos resaltan el papel de Tregs tímicos en el control de enfermedades autoinmunes y tolerancia al trasplante, además de ser consideradas en ensayos clínicos como terapia celular para el tratamiento y prevención de la enfermedad injerto contra huésped y rechazo de órganos sólidos. El principal obstáculo de estos ensayos es obtener el número suficiente de células, la falta de marcadores adecuados específicos para su adecuada purificación y los defectos intrínsecos que puedan interferir con su función supresora, haciéndolos no adecuados para su uso en la inmunoterapia. Por el contrario, las Tregs inducidas *in vitro* pueden ser generadas a partir de células TCD4⁺ “naive” que son más abundantes por lo que pueden ser purificadas en grandes números, además de las evidencias que respaldan a las iTregs como más estables y funcionales que las tTregs en condiciones de inflamación, y de ahí su ventaja en tratar enfermedades autoinmunes e inflamatorias como es en un escenario de trasplante de órganos, por lo que generar Tregs inducidas *in vitro* presentaría una alternativa ideal y una propuesta atractiva. Sin embargo, la expansión/ generación policlonal de células T reguladoras tienen la desventaja que estas se expanden/o generen de un pool existente con una amplia gama de reactividad en vez de selectivo hacia los aloantígenos. Por lo que el empleo de células Tregs aloespecíficas tendría la ventaja de evitar una supresión inmune general [259], debido a que su acción es altamente específica y localmente restringida, además que se requieren bajos números de células para una eficiente supresión.

En este trabajo se generaron y expandieron células T reguladoras aloespecíficas *in vitro* a partir de células T “naive” de individuos sanos, y se estableció una metodología

que permitió obtener un gran número de iTregs aloespecíficas con fenotipo y función supresora estable. Para obtener la aloespecificidad se realizaron cocultivos de las células T “naïve” de un individuo con células dendríticas inmaduras de otro individuo, que en un escenario de transplante sería el receptor y donante respectivamente. La habilidad de las células dendríticas para procesar y presentar múltiples epítomos las hace candidatas ideales para la generación de Tregs específicos para el antígeno. Las DCs en circulación son escasas y difíciles de mantener en cultivo, aunque se puede usar factores de crecimiento hematopoyéticos para la expansión *in vivo* de las DCs circulantes, sin embargo la mayoría de estudios clínicos y experimentales se basan en el desarrollo *in vitro* de células DCs a partir de células progenitoras CD34⁺ o monocitos sanguíneos; un proceso que también es relevante *in vivo* en condiciones de inflamación o infección, por la producción de GM-CSF por las células endoteliales y la secreción de mediadores proinflamatorios por parte de las células inmunes residentes en tejido [260]. En ambos sistemas humano y murino, los monocitos cultivados con GM-CSF e IL-4 se diferencian en DCs inmaduras caracterizadas por la baja expresión de MHC clase II y moléculas coestimuladoras. Estas DCs inmaduras derivadas de monocitos pueden volverse maduras mediante el tratamiento con componentes que inducen la maduración como son LPS, TNF- α , IFN- γ o CD40L [261]. Se ha establecido que la principal función de las DCs inmaduras en condiciones homeostáticas es capturar y procesar antígenos en la periferia y que este proceso mantendría la tolerancia a los antígenos propios. En efecto, varios reportes señalan que la presentación de antígenos a las células T por parte de las DCs inmaduras resulta en anergia o inducción de Tregs [262].

Para la generación de DCs inmaduras, se aislaron células CD14⁺ periféricas que fueron incubadas con GM-CSF que es añadido como un factor de crecimiento general, esencial para todas las DC convencionales e IL-4, que inhibe la vía de diferenciación

dominante que es hacia macrófagos [263]. Después de 8 días de cultivo aparecieron grupos de células no-adherentes, de mayor tamaño, largas y con numerosas proyecciones de su membrana, que expresan moléculas de superficies típicas de las células dendríticas y fueron capaces de inducir una respuesta alorreactiva al ser cocultivados con células TCD3⁺ (Figura 24). Un estudio compara la eficiencia de las células B-activadas vía CD40 (CD40-B) y DC inmaduras derivadas de monocitos para generar Tregs, y concluyen que las CD40-B fueron mejores en inducir y expandir Tregs, que a su vez son mejores supresoras que las inducidas por las DC inmaduras [264]. Sin embargo ellos no añaden IL-2 a los cocultivos y además reportan que las CD40-B son capaces de secretar IL-2, siendo esta citocina responsable de las diferencias observadas entre ambas APC alogénicas. En el presente trabajo se ha optimizado la metodología de inducción de Tregs, adicionando TGF- β , IL-2 y ATRA a los cocultivos DC y células T “naïve”, con el fin de mejorar la eficiencia de inducción de las DCs alogénicas (Figura 24C). La señalización del TGF- β promueve la unión del NFAT y SMAD3 a una región altamente conservada del gen del FOXP3 (CNS1) que funciona como "enhancer", que a su vez estimula la acetilación de la histona y la transcripción del FOXP3 [156], TGF- β e IL-2 son esenciales para la diferenciación de las pTregs, además se ha reportado que la señalización de IL-2 regula la expresión de FOXP3 mediante la unión directa de STAT5 al promotor y a la región CNS2 del gen FOXP3 [265]. La manera como actuaría el ATRA sería incrementando la señalización del SMAD3 promovido por el TGF- β e inhibiendo citocinas proinflamatorias de las células T de memoria [159, 160]. Unos estudios reportaron que la combinación de TGF- β + ácido retinoico (ATRA) incrementa la expresión de FOXP3 en CD4⁺CD25⁻CD45RA⁺, además de mejorar su función supresora in vitro [201]. Otra estrategia para mejorar la inducción de FOXP3, es mediante la adición de rapamicina que, además de inhibir la vía mTOR favoreciendo la

inducción de FOXP3, aumenta la señalización de TGF- β inhibiendo al SMAD7, un regulador negativo del receptor del TGF- β [157, 158].

Los cocultivos entre las células T “naïve” y células dendríticas inmaduras se realizaron en una proporción de 10:1, con el fin de conseguir una estimulación subóptima que favoreciera la inducción de FOXP3. La activación de la vía PI3K-AKT-mTOR dependiente del TCR es un importante regulador negativo de la diferenciación de Tregs en la periferia, ya que AKT inhibe la proteína FOXO que facilita la inducción de FOXP3, por lo que una débil señal del TCR favorece la conversión de iTregs a través de una baja activación de la vía PI3K-AKT-mTOR [26]. Por lo tanto, una eficiente generación de Tregs requiere una activación del TCR apropiada de los linfocitos T “naïve” por parte de las APC, de manera que se consiga una coestimulación subóptima [266]. Cuando se realizaron cocultivos de diferentes proporciones entre las DCs esplénicas y células T CD4⁺CD25⁻FOXP3⁻ murinas, se encontró que la proporción 1 DC: 10 células T fue la que mejor generó células T FOXP3⁺, mientras que proporciones menores disminuían el éxito de inducción [267]. En el presente trabajo, los cocultivos se realizaron en una proporción de 1 DC: 10 células T “naïve”, proporción que resultó un una mayor inducción de FOXP3 y la proliferación de las células generadas. Esta proporción también se encuentra reportada en otros trabajos. Así, Jonuleit *et al.*, lograron inducir Tregs mediante cocultivos de DC inmaduras alogénicas y células T “naïve” en un proporción de 1:10 [172] y lo mismo se reportó en cocultivos entre células B (activadas por CD40) y células T “naïve” [207]. Sin embargo, a diferencia de los mencionados, en este trabajo se utilizaron DCs irradiadas en los cocultivos, para disminuir la liberación de mediadores por parte de las DCs que pudieran interferir con la generación de Tregs [268, 269]; es decir que las DC sólo fueran una fuente de

presentación antigénica por las MHC y de moléculas de superficie y de ese modo conseguir una respuesta uni-direccional.

Las células T aloespecíficas generadas en los cocultivos se aislaron en base a los marcadores CD25⁺ y CFSE⁻, que corresponden a aquellas que vieron al antígeno, se activaron y proliferaron. Debido a que las células no pueden ser “aisladas” en base a FOXP3 por ser un marcador intracelular, se aislaron aquellas que fueron CD25^{hi} por la correlación positiva que tiene su expresión con FOXP3 [270]. De las condiciones realizadas, las células proliferantes que contenían ATRA y/o RAPA expresaron una mayor intensidad de FOXP3; sin embargo con RAPA, que también detiene el ciclo celular [271], el número de células obtenidas en el cultivo fue mucho menor haciendo complicado su aislamiento para una posterior expansión. Por este motivo, se optó por la condición de ATRA, puesto que además del número mayor de células obtenidas, está reportada su contribución epigenética en FOXP3, dado que incrementa la metilación y acetilación de histonas dentro del promotor y regiones no codificantes (CNS) del gen FOXP3 [272].

Para la generación y expansión a gran escala de células T reguladoras aloespecíficas obtenidas en el presente estudio, se utilizó una estrategia de dos pasos: primero la generación de iTregs a lo mediante cocultivos células T “naïve” y DC derivadas de monocitos, y segundo el aislamiento de las iTregs generadas y su expansión policlonal durante 6 semanas. Esta misma técnica fue reportada en otro trabajo en que expandieron Tregs tímicas para uso clínico [169] en que se consiguió una expansión de 100 a 1600 veces, aunque también se reportaron otras estrategias como la expansión con sólo altas dosis de IL-2, sin necesidad de re-estimulación después del “sorting” de las Tregs aloespecíficas [273]. Por otro lado otra estrategia utilizó la re-estimulación de las Tregs tímicas mediante adición constante de las APC alogénicas en los cocultivos, sin

“sorting” [167] para la expansión de las iTregs generadas a partir de células T “naïve”, donde se consiguieron expandir hasta 8 veces el número inicial [264]. En este trabajo se aislaron las Tregs aloespecíficas generadas para su posterior expansión policlonal, evitando los inconvenientes de re-estimulación repetitiva en el mismo cocultivo y la persistencia de Tregs con otras especificidades que pudiesen entorpecer la expansión de las Tregs aloespecíficas de interés.

Las células aisladas fueron expandidas con perlas anti CD3/CD28, aunque en una proporción menor que la utilizada para la expansión de las Treg tímicas (3 perlas: 1 célula). Se observó que cuando recibían un fuerte estímulo (3:1), muchas de ellas morían en la primera semana, por lo que se fue estandarizando esta proporción hasta encontrar la proporción ideal que les permitieran proliferar por varias semanas sin conducir a la muerte. Si bien, con la proporción adecuada (1 perla: 2 células) aún se observa algo de muerte en la primera semanas, éstas se fueron mejorando hasta llegar a un 90% de viabilidad en la 6ta semana, que nos señala que el estímulo del TCR utilizado para su expansión es el adecuado, que se vio reflejada en la proliferación celular que alcanzó a 230×10^3 veces el número inicial, siendo el mayor número reportado hasta el momento en expansión y/o generación de Tregs aloespecíficas. Cabe recalcar que se partió de una cantidad de 20×10^3 células iTregs aloespecíficas, es decir al finalizar la 6ta semana se llegó a tener $4,600 \times 10^6$ iTregs aloespecíficas. Según los ensayos clínicos donde emplearon Tregs tímicas expandidas con perlas antiCD3/CD28, el promedio de células necesario para obtener una supresión adecuada es de 10 a 20×10^6 cells/kg por paciente [274]. Es decir, en un paciente de 70 kilos se necesitarían un aproximado de $700-1,400 \times 10^6$ de Tregs, por lo que con el número alcanzado sería posible infundir varias dosis de estas células. Además, considerando que se está calculando con las 20×10^3 células iTregs aloespecíficas iniciales, y por lo general en

50 mililitros de sangre se pueden obtener hasta 500×10^3 células T “naïve” se podrían generar hasta 200×10^3 células iTregs aloespecíficas de cada muestra de paciente, Por último, está reportado que el número requerido para ejercer una supresión ideal es menor con las Tregs aloespecíficas que la requerida con las policlonales, haciendo más factible su aplicación como terapia adoptiva.

Además del estímulo policlonal, los cultivos fueron suplementados con IL-2 y RAPA, el primero dado su papel en la expresión de FOXP3 [275], y el segundo por su papel como inhibidor de la vía mTOR, con el fin de disminuir la señal del TCR por los ciclos repetidos de activación usados [69]. El hecho de que las células proliferaran en gran medida en presencia de RAPA, a pesar de ser una inhibidor de la proliferación, nos lleva a pensar que las células en cultivo adquirieron las características de Tregs, dado que ellas dependen para su proliferación de la vía JAK/STAT mediada por IL-2R que no es inhibida por RAPA, además de expresar altos niveles de PTEN, un inhibidor negativo de la vía mTOR. De manera contraria, las células T convencionales responden a las señales del TCR e IL-2, mediante la vía de PI3K que es sensible a los efectos de la rapamicina [276]. Se reportó que para una generación efectiva de Tregs es necesario que se inhiban ambos complejos que conforman la cinasa mTOR: mTORC1 y mTORC2 [277]. La rapamicina sólo inhibe la señalización de mTORC1, mientras que su efecto sobre mTORC2 es variable y requiere un tiempo prolongado de tratamiento [278]. La inhibición de mTORC2 promueve la expresión de FOXP3, dado que se activan los factores de transcripción FOXO1 y FOXO3a [279]. Es probable que el tratamiento prolongado de nuestros cultivos con rapamicina tenga que ver con el incremento en la frecuencia de células $CD25^+FOXP3^+$ a medida que pasan las semanas de cultivo de expansión (Figura 25C). Es importante, mencionar que en cada ciclo de expansión las células tuvieron 3 días de reposo con sólo IL-2, al término del cual se analizó el

fenotipo para disminuir la activación continua que recibe en cada ciclo y evitar su muerte por activación en el siguiente ciclo, así como reducir la expresión de marcadores que se puedan prender sólo por activación como CD25 y FOXP3, que puedan sobre-enmascarar la frecuencia y función de iTregs en nuestros ensayos.

La expresión de CD25 y CTLA-4 tuvo una tendencia a ser homogéneo durante todo el trascurso de cultivo de expansión de iTregs, indicando que desde la primera semana las células en cultivo expresaban los mismos niveles de ambos marcadores de membrana, que no se vio afectada por la re-estimulación continua. Sin embargo, la expresión de FOXP3 fue incrementándose hasta alcanzar un promedio máximo en la cuarta semana para ir reduciéndose en las dos semanas siguientes, aunque sin llegar a niveles significativos. Es probable que los ciclos repetitivos de estimulación a través del TCR puedan estar afectando a las células en cultivo, de manera que lleguen a disminuir la expresión de FOXP3, sin embargo no se encuentra pérdida del fenotipo Tregs, más bien llegan a uniformizarse en las 6ta semana. Esto puede sugerir que las células expandidas durante 6 semanas, lograron adquirir un fenotipo estable como células T reguladoras, probablemente por los repetidos ciclos de terminación de la señal a través del TCR [69], dado que la estimulación con las perlas sólo se dio por cuatro días y luego se retiraban durante el reposo, o por el tratamiento prolongado con rapamicina como se explicó anteriormente [277]; sin embargo esta estabilidad sólo puede corroborarse con estudios de metilación en la región TSDR del gen FOXP3 de las células en cultivo.

Dado que en un escenario de trasplante de órganos, las Tregs deben estar en continua presencia de citocinas proinflamatorias, ellas deben ser capaces de mantener su fenotipo y función en este ambiente. Poco tiempo después de un trasplante, las células inmunes son activadas por señales del daño que resulta en la producción de citocinas proinflamatorias. Se ha reportado que TNF- α sinergiza con IL-6 para prevenir la

tolerancia al trasplante en injerto de piel, además que ambos incrementan la proliferación de las células T efectoras, haciéndoles menos susceptibles a la regulación inmune [280]. La presencia de citocinas proinflamatorias puede afectar la función supresora de las Tregs directa o indirectamente. Entre ellos se encuentra TNF- α , donde se reportó que la unión a su receptor sobre las Tregs induce la fosfatasa PP1 el cual defosforila la región C-terminal del gen FOXP3 afectando su función como factor de transcripción resultando en una reducción de la función de las Tregs [281]. Por este motivo, se expandieron las Tregs por una o dos semanas con las citocinas más relevantes como son IL-6 y TNF- α , dado que su presencia es de importancia en un proceso de rechazo y porque se ha reportado que las Tregs en presencia de IL-6 y TGF- β son capaces de diferenciarse a TH17 [282] y que TNF- α es capaz de afectar la expresión de FOXP3 [283]. Cuando las iTregs alo expandidas por cuatro semanas fueron puestas en cultivo por una o dos semanas con IL-6 y/o TNF- α , no se observaron diferencias en cuanto su fenotipo y expresión de CD25, FOXP3 y CTLA-4 (Figura 26); esto indicaría que nuestras células generadas son estables ante el efecto de IL-6 y TNF- α . En un modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental, se ha reportado que las iTregs son sensibles al efecto del TNF- α mediante AKT y SMAD3, donde la unión de TNF- α a su receptor activa AKT, que a su vez interactúa con SMAD3, resultando en la inhibición de la fosforilación de SMAD3-inducido por TGF- β y como consecuencia, menos unión de SMAD3 fosforilado a la región promotora del gen FOXP3 [284]; probablemente la inhibición de la vía PI3K/AKT/mTOR por rapamicina pueda contribuir en esta estabilidad observada en nuestros cultivos. Por otra parte se ha señalado que el tratamiento de las iTregs con IL-6 no afecta la expresión de FOXP3 ni su actividad supresora *in vitro* en comparación con las Tregs tímicas y fue explicado por

la baja expresión del receptor para IL-6 por efecto de IL-2 y TGF- β , sugiriendo que las iTregs son más efectivas en un ambiente inflamatorio [189].

Estas células expandidas ejercen supresión aloespecífica que se mantiene en presencia de las citocinas IL-6 + TNF- α y además no pierden la función supresora al ser expandidas por dos semanas con las mismas citocinas (Figura 27 y 28); es importante señalar que la supresión no se da ante un antígeno extraño no relacionado (Third party) lo que sugiere que la respuesta a otros antígenos, como una infección bacteriana o viral no se vería afectada con la infusión de estas células como terapia adoptiva. Aunque no se hicieron los ensayos de transwell para evaluar qué tipo de supresión es la predominante, ya sea por contacto o liberación de citocinas, es probable que ambos tengan un papel importante. Nuestras iTregs expandidas por 6 semanas presentaron una alta expresión de CTLA-4 (Figura 25E), que es importante para la supresión por contacto mediante interacción con CD80/CD86 de las DCs influyendo en su función como APC [285], además en los ensayos de sobrenadantes se observó una reducción de IL-2 en los cocultivos de supresión, por lo que mediante la deprivación de IL-2 por parte de las Tregs se estaría inhibiendo la respuesta de las células T convencionales [286] y por último se encontró un incremento en la producción de IL-10 que es una citocina inmunosupresora que actúa regulando la función de las APCs e inhibiendo la proliferación de las células T [91] y en la producción de IFN- γ (Figura 29). Si bien el IFN- γ es considerada como una citocina proinflamatoria, existen evidencias que indican su papel inmuno-regulador. Se ha reportado en un modelo GVHD experimental que más del 50% de las células Tregs transferidas producen IFN- γ después del trasplante y que ellas fueron requeridas para la prevención efectiva del GVHD experimental [287]. Además se señaló que el IFN γ era crítico para la conversión de células T CD4⁺CD25⁻ en Tregs en un modelo EAE, corroborándose *in vitro* donde el tratamiento de las células T

“naïve” humanas y murinas con IFN γ resultó en su conversión a Tregs, caracterizado por un incremento en la expresión de FOXP3 y funciones reguladoras [288]. Si bien hasta el momento no se sabe cómo estaría actuando IFN γ sobre las Tregs, se propone que podría influir en su función vía inducción de receptores para quimiocinas como CXCR3 para su migración efectiva al órgano blanco o bien induciendo la síntesis del óxido nítrico por parte de otras células inmunes o induciendo la expresión de FOXP3 en las células T, probablemente vía STAT1 [289].

Si bien estas células mantuvieron su fenotipo y función en presencia de citocinas proinflamatorias, ellas necesitan de TGF- β y sobre todo de rapamicina para conservar su fenotipo y expresión de FOXP3 (Figura 30), indicando que estas moléculas, además de IL-2, deben ser consideradas como terapia adjunta si se quiere utilizar las células iTregs expandidas en la terapia clínica. En un modelo murino de GVHD se observó que las iTregs transferidas perdían su expresión de FOXP3 y se convertían a células T efectoras después de tres semanas, sin embargo la administración de rapamicina con/sin IL-2 a los receptores trasplantados significativamente incrementó la estabilidad de FOXP3 y funciones supresoras en las iTregs que fueron detectables hasta 12 semanas después de ser transferidas [290].

La expresión estable de FOXP3 en las células Tregs depende de la desmetilación del DNA en una región conservada rica de CpG dentro del locus FOXP3, denominada TSDR, que no es requerida para la iniciación de la expresión de FOXP3 pero sí para su mantenimiento [186]. Si bien esta región no fue evaluada en nuestras células expandidas, la alteración observada de su fenotipo al quitar TGF- β y rapamicina nos podría sugerir de una inestabilidad, esto no se puede saber hasta no hacer un análisis epigenético de la región TSDR. Reportes señalaron que ninguno de los dos agentes ATRA y RAPA modificaron el estado de metilación de esta región cuando las iTregs

son generadas a partir de células T “naïve” [291, 292]. Sin embargo estos estudios además de ser policlonales, se realizaron en cultivos de menos de una semana de inducción, a diferencia de nosotros que es de 6 semanas de expansión, por lo que sería un gran aporte saber el estado de metilación de esta región, que pueda estar modificado por la re-estimulación continua a través de su TCR y tratamiento prolongado con rapamicina.

Un estudio señaló que no encontraron incremento en la expresión de FOXP3 y su función supresora al inhibir el DNA metiltransferasa con Decitabine de las iTregs generadas, sugiriendo que el estado de metilación de FOXP3 no controla la inducción de Tregs [202]. Además existen reportes que señalan una función supresora estable en iTregs sin necesidad de una TSDR desmetilada, además que estas iTregs fueron muy efectivas en la prevención y tratamiento de complicaciones como GVDH o encefalomiелitis alérgica [293, 294]. Una de las explicaciones es que aunque la región TSDR de la iTregs generadas *in vitro* se encuentra metilada, su desmetilación pueda ser establecida *in vivo* después de ser transferidas en el organismo. Sela *et al*, reportó que las iTregs transferidas a los ratones alogénicos previenen el GVDH, persisten por más de 6 meses y mantienen la región CNS2 del gen FOXP3 completamente desmetilada [267]. O incluso puede ser inducido *in vivo* mediante la administración de IL-2, donde reportaron que las iTregs generadas *in vitro* adquieren la desmetilación del TSDR *in vivo* solo después del tratamiento de los ratones con IL-2 [295]. Así como rapamicina, que mejora la estabilidad y función de las iTregs transferidas, siendo detectables después de 12 semanas de infusión [290]. Por último, trabajos recientes publicaron que es posible incrementar el estado de desmetilación de la región TSDR mediante la adición de vitamina C a los cultivos de iTregs [208, 296], que fue reportada como un activador de las enzimas TET, que a su vez controlan la estabilidad del FOXP3 [199]. Si

bien estos reportes sugieren la estabilidad y aplicación efectiva de las iTregs generadas *in vitro*, su aplicación en la terapia clínica requiere tener información sobre el estado de desmetilación de la región TSDR, además de considerar otros agentes adjuntos como IL-2 y rapamicina, con el objetivo de mejorar la estabilidad de las iTregs transferidas en el organismo.

En resumen, el tratamiento prolongado con Belatacept en los pacientes trasplantados, puede tener un efecto adverso en la frecuencia, función y estado de metilación del TSDR FOXP3 de las células T reguladoras CD4⁺CD25^{HI}CD127^{LO}FOXP3⁺. Si bien estos pacientes presentan función estable del injerto, las ventajas clínicas observadas con Belatacept no pueden ser explicadas evaluando a las células T CD4⁺CD25^{HI}CD127^{LO}FOXP3⁺ circulantes. Estos resultados ayudarán a orientar en el diseño de terapias clínicas basadas en el empleo de células T reguladoras provenientes de pacientes trasplantados bajo tratamiento inmunosupresor prolongado.

Una alternativa para la obtención y aplicación de las Tregs en la terapia clínica, es su generación *in vitro* a partir de células T “naïve”. En este trabajo se desarrolló una metodología idónea donde se lograron generar y expandir en grandes números células T reguladoras aloespecíficas con fenotipo y función supresora estable en condiciones de inflamación. Su estabilidad, especificidad y número conseguido por primera vez, las hace candidatas en la inmunoterapia celular y sienta las bases en el desarrollo de estrategias para la generación *in vitro* de iTregs a gran escala.

CONCLUSIONES

1. Los pacientes con trasplante renal mantenidos durante largo tiempo con Belatacept o Ciclosporina presentan una reducción significativa del número y porcentaje de Tregs circulantes.
2. Las Treg de pacientes tratados con Belatacept o Ciclosporina muestran una función supresora disminuida.
3. La función alterada de las Treg de pacientes trasplantados se correlaciona con un incremento en la metilación del TSDR de la región CNS2 del gen de FOXP3.
4. Se optimizó el protocolo para la obtención de un gran número de células T reguladoras antígeno -específicas con fenotipo y supresión estable.
5. El fenotipo CD25⁺FOXP3⁺ y su expresión en las iTregs generadas no se ve afectada cuando son expandidas en presencia de las citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α .
6. Las iTregs generadas presentan una supresión específica hacia el antígeno del donante y no hacia un tercero, esta supresión no se vio afectada en presencia de las citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α .
7. Las iTregs generadas requieren principalmente de rapamicina en los cultivos de expansión para mantener su fenotipo y expresión de FOXP3.

PERSPECTIVAS

1. Para determinar el impacto in situ de Belatacept, se debería evaluar el efecto directo (fenotipo y función) de varias concentraciones de esta droga sobre la generación y expansión de células T reguladoras en co-cultivos con DCs alogénicas.
2. Estudiar las vías de señalización que estarían implicadas en la falta de desmetilación de la región TSDR de los pacientes trasplantados y bajo tratamiento con Belatacept, como es el nivel de expresión de las enzimas TET, u otras implicadas en el nivel de expresión de FOXP3, como las vías de IL-2 y CD28.
3. Generar y expandir las iTregs alo en presencia de vitamina C, por su efecto sobre las enzimas TET. Evaluar marcadores que participan en la tráfico celular.
4. Validar las células generadas y expandidas en un modelo in vivo (ratones humanizados), la migración, estabilidad y funcionalidad para la inducción de tolerancia.

REFERENCIAS

1. Game, D.S. and R.I. Lechler, *Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance*. *Transpl Immunol*, 2002. **10**(2-3): p. 101-8.
2. Lechler, R.I., et al., *Organ transplantation--how much of the promise has been realized?* *Nat Med*, 2005. **11**(6): p. 605-13.
3. Lechler, R.I., O.A. Garden, and L.A. Turka, *The complementary roles of deletion and regulation in transplantation tolerance*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(2): p. 147-58.
4. Golshayan, D. and M. Pascual, *Tolerance-inducing immunosuppressive strategies in clinical transplantation: an overview*. *Drugs*, 2008. **68**(15): p. 2113-30.
5. Ferrer, I.R., et al., *Induction of transplantation tolerance through regulatory cells: from mice to men*. *Immunol Rev*, 2014. **258**(1): p. 102-16.
6. Felix, N.J. and P.M. Allen, *Specificity of T-cell alloreactivity*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(12): p. 942-53.
7. Boardman, D.A., et al., *What Is Direct Allorecognition?* *Current Transplantation Reports*, 2016. **3**(4): p. 275-283.
8. Spearman, C.W.N. and Z.A. Barday, *Immune tolerance and immunosuppression in solid organ transplantation*. *S Afr Med J*, 2014. **104**(11): p. 7307.
9. Starr, T.K., S.C. Jameson, and K.A. Hogquist, *Positive and negative selection of T cells*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 139-76.
10. Smith-Garvin, J.E., G.A. Koretzky, and M.S. Jordan, *T Cell Activation*. *Annual review of immunology*, 2009. **27**: p. 591-619.
11. Chakraborty, A.K. and A. Weiss, *Insights into the initiation of TCR signaling*. *Nature immunology*, 2014. **15**(9): p. 798-807.
12. Maruyama, T., et al., *Control of the differentiation of regulatory T cells and T(H)17 cells by the DNA-binding inhibitor Id3*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(1): p. 86-95.
13. Josefowicz, S.Z., C.B. Wilson, and A.Y. Rudensky, *Cutting edge: TCR stimulation is sufficient for induction of Foxp3 expression in the absence of DNA methyltransferase 1*. *J Immunol*, 2009. **182**(11): p. 6648-52.
14. Mantel, P.Y., et al., *GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells*. *PLoS Biol*, 2007. **5**(12): p. e329.
15. Scheuher, C., *A Review of Organ Transplantation: Heart, Lung, Kidney, Liver, and Simultaneous Liver-Kidney*. *Crit Care Nurs Q*, 2016. **39**(3): p. 199-206.
16. Watson, C.J. and J.H. Dark, *Organ transplantation: historical perspective and current practice*. *Br J Anaesth*, 2012. **108 Suppl 1**: p. i29-42.
17. Ponticelli, C., *Ischaemia-reperfusion injury: a major protagonist in kidney transplantation*. *Nephrol Dial Transplant*, 2014. **29**(6): p. 1134-40.
18. Tonelli, M., et al., *Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes*. *Am J Transplant*, 2011. **11**(10): p. 2093-109.
19. Abecassis, M., et al., *Kidney transplantation as primary therapy for end-stage renal disease: a National Kidney Foundation/Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF/KDOQIM) conference*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2008. **3**(2): p. 471-80.
20. Romagnani, P., et al., *Chronic kidney disease*. *Nat Rev Dis Primers*, 2017. **3**: p. 17088.
21. Moreau, A., et al., *Effector Mechanisms of Rejection*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013. **3**(11).
22. Amrouche, L., et al., *Long-term Outcomes of Kidney Transplantation in Patients With High Levels of Preformed DSA: The Necker High-Risk Transplant Program*. *Transplantation*, 2017. **101**(10): p. 2440-2448.
23. Seija, M., et al., *Rechazo agudo del trasplante renal: diagnóstico y alternativas terapéuticas*. *Nefrología Latinoamericana*, 2017. **14**(4): p. 119-130.

24. Bhatti, A.B. and M. Usman, *Chronic Renal Transplant Rejection and Possible Anti-Proliferative Drug Targets*. Cureus, 2015. **7**(11): p. e376.
25. DANIEL SERÓN MICAS and F.M. MATEOS, *Disfunción crónica tardía del trasplante renal*, in *Revista de nefrología*. 2012.
26. Yuan, X. and T.R. Malek, *Cellular and molecular determinants for the development of natural and induced regulatory T cells*. Hum Immunol, 2012. **73**(8): p. 773-82.
27. Ali, J.M., et al., *Allorecognition pathways in transplant rejection and tolerance*. Transplantation, 2013. **96**(8): p. 681-8.
28. Wang, Y., M.A. Su, and Y.Y. Wan, *An essential role of the transcription factor GATA-3 for the function of regulatory T cells*. Immunity, 2011. **35**(3): p. 337-48.
29. Nakayama, T. and M. Yamashita, *The TCR-mediated signaling pathways that control the direction of helper T cell differentiation*. Semin Immunol, 2010. **22**(5): p. 303-9.
30. Appleman, L.J. and V.A. Boussiotis, *T cell anergy and costimulation*. Immunol Rev, 2003. **192**: p. 161-80.
31. Valenzuela, J., C. Schmidt, and M. Mescher, *The roles of IL-12 in providing a third signal for clonal expansion of naive CD8 T cells*. J Immunol, 2002. **169**(12): p. 6842-9.
32. Curtsinger, J.M., et al., *Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells*. J Immunol, 1999. **162**(6): p. 3256-62.
33. Eun, S.C., *Composite tissue allotransplantation immunology*. Arch Plast Surg, 2013. **40**(2): p. 141-53.
34. Golshayan, D. and M. Pascual, *Tolerance-Inducing Immunosuppressive Strategies in Clinical Transplantation*. Drugs, 2008.
35. LaRosa, D.F., A.H. Rahman, and L.A. Turka, *The innate immune system in allograft rejection and tolerance*. J Immunol, 2007. **178**(12): p. 7503-9.
36. Cucchiari, D., M.A. Podesta, and C. Ponticelli, *The Critical Role of Innate Immunity in Kidney Transplantation*. Nephron, 2016. **132**(3): p. 227-37.
37. Jones, N.D., et al., *Differential Susceptibility of Heart, Skin, and Islet Allografts to T Cell-Mediated Rejection*. The Journal of Immunology, 2001. **166**(4): p. 2824-2830.
38. Halloran, P.F., *Immunosuppressive drugs for kidney transplantation*. N Engl J Med, 2004. **351**(26): p. 2715-29.
39. Salvadori, M. and E. Bertoni, *[Side effects and toxicity of immunosuppressive agents]*. G Ital Nefrol, 2003. **20**(5): p. 490-502.
40. de Mattos, A.M., A.J. Olyaei, and W.M. Bennett, *Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: Long-term consequences and challenges for the future*. American Journal of Kidney Diseases, 2000. **35**(2): p. 333-346.
41. Marcen, R., et al., *Evolution of rejection rates and kidney graft survival: a historical analysis*. Transplant Proc, 2009. **41**(6): p. 2357-9.
42. Wojciechowski, D. and F. Vincenti, *Belatacept in kidney transplantation*. Curr Opin Organ Transplant, 2012. **17**(6): p. 640-7.
43. Vincenti, F., et al., *Belatacept and Long-Term Outcomes in Kidney Transplantation*. N Engl J Med, 2016. **374**(4): p. 333-43.
44. Sachs, D.H., *Transplant Tolerance: Bench to Bedside 26th Annual Samuel Jason Mixter Lecture*. Arch Surg, 2011. **146**(5): p. 501-5.
45. Alpdogan, O. and M.R. van den Brink, *Immune tolerance and transplantation*. Semin Oncol, 2012. **39**(6): p. 629-42.
46. Xing, Y. and K.A. Hogquist, *T-cell tolerance: central and peripheral*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(6).
47. Intlekofer, A.M. and C.B. Thompson, *At the Bench: Preclinical rationale for CTLA-4 and PD-1 blockade as cancer immunotherapy*. J Leukoc Biol, 2013. **94**(1): p. 25-39.
48. Bouillet, P. and L.A. O'Reilly, *CD95, BIM and T cell homeostasis*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(7): p. 514-9.

49. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells and immune tolerance*. Cell, 2008. **133**(5): p. 775-87.
50. Scalea, J.R., et al., *Transplantation Tolerance Induction: Cell Therapies and Their Mechanisms*. Front Immunol, 2016. **7**.
51. Kawai, T. and A.B. Cosimi, *Induction of tolerance in clinical kidney transplantation*. Clin Transplant, 2010. **24**(0 22): p. 2-5.
52. Brunkow, M.E., et al., *Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 68-73.
53. Bennett, C.L., et al., *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 20-1.
54. Zhou, Z., et al., *FOXP3 and its partners: structural and biochemical insights into the regulation of FOXP3 activity*. Immunol Res, 2008. **42**(1-3): p. 19-28.
55. Deng, G., et al., *Molecular and biological role of the FOXP3 N-terminal domain in immune regulation by T regulatory/suppressor cells*. Exp Mol Pathol, 2012. **93**(3): p. 334-8.
56. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
57. Curotto de Lafaille, M.A. and J.J. Lafaille, *Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?* Immunity, 2009. **30**(5): p. 626-35.
58. Josefowicz, S.Z. and A. Rudensky, *Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 616-25.
59. Aschenbrenner, K., et al., *Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(4): p. 351-8.
60. Li, J., et al., *Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus*. J Exp Med, 2009. **206**(3): p. 607-22.
61. Leventhal, D.S., et al., *Dendritic Cells Coordinate the Development and Homeostasis of Organ-Specific Regulatory T Cells*. Immunity, 2016. **44**(4): p. 847-59.
62. Perry, J.S.A., et al., *Distinct contributions of Aire and antigen-presenting-cell subsets to the generation of self-tolerance in the thymus*. Immunity, 2014. **41**(3): p. 414-426.
63. Herbin, O., et al., *Medullary Thymic Epithelial Cells and CD8 α (+) Dendritic Cells coordinately regulate central tolerance but CD8 α (+) cells are Dispensable for Thymic Regulatory T cell production*. J Autoimmun, 2016. **75**: p. 141-9.
64. Hsieh, C.S., H.M. Lee, and C.W. Lio, *Selection of regulatory T cells in the thymus*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(3): p. 157-67.
65. Lio, C.W. and C.S. Hsieh, *A two-step process for thymic regulatory T cell development*. Immunity, 2008. **28**(1): p. 100-11.
66. Haiqi, H., Z. Yong, and L. Yi, *Transcriptional regulation of Foxp3 in regulatory T cells*. Immunobiology, 2011. **216**(6): p. 678-85.
67. Yu, A., et al., *A low interleukin-2 receptor signaling threshold supports the development and homeostasis of T regulatory cells*. Immunity, 2009. **30**(2): p. 204-17.
68. Huynh, A., et al., *The phosphatase PTEN-mediated control of PI-3 kinase in T(regs) cells maintains homeostasis and lineage stability*. Nat Immunol, 2015. **16**(2): p. 188-96.
69. Sauer, S., et al., *T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(22): p. 7797-802.
70. Ouyang, W., et al., *Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2010. **11**(7): p. 618-27.
71. Ouyang, W., et al., *Transforming Growth Factor- β Signaling Curbs Thymic Negative Selection Promoting Regulatory T Cell Development*. Immunity, 2010. **32**(5): p. 642-53.

72. Lin, X., et al., *Advances in distinguishing natural from induced Foxp3(+) regulatory T cells*. Int J Clin Exp Pathol, 2013. **6**(2): p. 116-23.
73. Groux, H., et al., *A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis*. Nature, 1997. **389**(6652): p. 737-42.
74. Gagliani, N., et al., *Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells*. Nat Med, 2013. **19**(6): p. 739-46.
75. Zeng, H., et al., *Type 1 regulatory T cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance*. Cell Mol Immunol, 2015. **12**(5): p. 566-71.
76. Gravano, D.M. and K.K. Hoyer, *Promotion and prevention of autoimmune disease by CD8+ T cells*. J Autoimmun, 2013. **45**: p. 68-79.
77. Brimnes, J., et al., *Defects in CD8+ regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease*. J Immunol, 2005. **174**(9): p. 5814-22.
78. Eusebio, M., et al., *Low frequency of CD8+CD25+FOXP3(BRIGHT) T cells and FOXP3 mRNA expression in the peripheral blood of allergic asthma patients*. J Biol Regul Homeost Agents, 2012. **26**(2): p. 211-20.
79. Najafian, N., et al., *Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model*. J Clin Invest, 2003. **112**(7): p. 1037-48.
80. Menager-Marcq, I., et al., *CD8+CD28- regulatory T lymphocytes prevent experimental inflammatory bowel disease in mice*. Gastroenterology, 2006. **131**(6): p. 1775-85.
81. Hanninen, A. and L.C. Harrison, *Gamma delta T cells as mediators of mucosal tolerance: the autoimmune diabetes model*. Immunol Rev, 2000. **173**: p. 109-19.
82. Kühl, A.A., et al., *Human peripheral $\gamma\delta$ T cells possess regulatory potential*. Immunology, 2009. **128**(4): p. 580-8.
83. Bocian, K., et al., *Expanding Diversity and Common Goal of Regulatory T and B Cells. I: Origin, Phenotype, Mechanisms*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2017.
84. Schmidt, A., N. Oberle, and P. Krammer, *Molecular Mechanisms of Treg-Mediated T Cell Suppression*. Frontiers in Immunology, 2012. **3**(51).
85. Ernst, P.B., J.C. Garrison, and L.F. Thompson, *Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology*. J Immunol, 2010. **185**(4): p. 1993-8.
86. Schmidt, A., et al., *Human regulatory T cells rapidly suppress T cell receptor-induced Ca(2+), NF-kappaB, and NFAT signaling in conventional T cells*. Sci Signal, 2011. **4**(204): p. ra90.
87. Huang, C.-T., et al., *Role of LAG-3 in regulatory T cells*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 503-13.
88. 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.
89. Miyara, M. and S. Sakaguchi, *Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression*. Trends Mol Med, 2007. **13**(3): p. 108-16.
90. Koch, M.A., et al., *The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation*. Nat Immunol, 2009. **10**(6): p. 595-602.
91. Schmidt, A., N. Oberle, and P.H. Krammer, *Molecular Mechanisms of Treg-Mediated T Cell Suppression*. Front Immunol, 2012. **3**.
92. Wei, S., I. Kryczek, and W. Zou, *Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking*. Blood, 2006. **108**(2): p. 426-31.
93. Schneider, M.A., et al., *CCR7 is required for the in vivo function of CD4(+) CD25(+) regulatory T cells*. J Exp Med, 2007. **204**(4): p. 735-45.
94. 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.
95. Thornton, A.M., et al., *Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells*. J Immunol, 2010. **184**(7): p. 3433-41.

96. Yadav, M., et al., *Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo*. J Exp Med, 2012. **209**(10): p. 1713-22, S1-19.
97. Akimova, T., et al., *Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e24226.
98. Weiss, J.M., et al., *Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells*. J Exp Med, 2012. **209**(10): p. 1723-42, S1.
99. Daniel, C. and H. von Boehmer, *Extra-thymically induced regulatory T cells: do they have potential in disease prevention?* Semin Immunol, 2011. **23**(6): p. 410-7.
100. Haribhai, D., et al., *A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity*. Immunity, 2011. **35**(1): p. 109-22.
101. Miyao, T., et al., *Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells*. Immunity, 2012. **36**(2): p. 262-75.
102. Polansky, J.K., et al., *DNA methylation controls Foxp3 gene expression*. Eur J Immunol, 2008. **38**(6): p. 1654-63.
103. 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.
104. Kitagawa, Y., N. Ohkura, and S. Sakaguchi, *Molecular determinants of regulatory T cell development: the essential roles of epigenetic changes*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 106.
105. Taylor, P.A., R.J. Noelle, and B.R. Blazar, *CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade*. J Exp Med, 2001. **193**(11): p. 1311-8.
106. Hara, M., et al., *IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo*. J Immunol, 2001. **166**(6): p. 3789-96.
107. Alvarez, C.M., et al., *Kidney transplant patients with long-term graft survival have altered expression of molecules associated with T-cell activation*. Transplantation, 2004. **78**(10): p. 1541-7.
108. 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.
109. 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.
110. Brinkman, C.C., et al., *Treg engage lymphotoxin beta receptor for afferent lymphatic transendothelial migration*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 12021.
111. Burrell, B.E., et al., *Regulatory T cell induction, migration, and function in transplantation*. J Immunol, 2012. **189**(10): p. 4705-11.
112. Eljaafari, A., et al., *Isolation of regulatory T cells in the skin of a human hand-allograft, up to six years posttransplantation*. Transplantation, 2006. **82**(12): p. 1764-8.
113. Baan, C.C., I.E. Dijke, and W. Weimar, *Regulatory T cells in alloreactivity after clinical heart transplantation*. Curr Opin Organ Transplant, 2009. **14**(5): p. 577-82.
114. 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.
115. 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.
116. De Serres, S.A., M.H. Sayegh, and N. Najafian, *Immunosuppressive drugs and Tregs: a critical evaluation!* Clin J Am Soc Nephrol, 2009. **4**(10): p. 1661-9.
117. Zeiser, R., et al., *Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production*. Blood, 2006. **108**(1): p. 390-9.

118. Wu, Y., et al., *FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT*. Cell, 2006. **126**(2): p. 375-87.
119. Presser, D., et al., *Differential kinetics of effector and regulatory T cells in patients on calcineurin inhibitor-based drug regimens*. Kidney Int, 2009. **76**(5): p. 557-66.
120. van de Wetering, J., et al., *Discontinuation of calcineurin inhibitors treatment allows the development of FOXP3+ regulatory T-cells in patients after kidney transplantation*. Clin Transplant, 2011. **25**(1): p. 40-6.
121. Zeiser, R., et al., *Differential impact of mammalian target of rapamycin inhibition on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells compared with conventional CD4+ T cells*. Blood, 2008. **111**(1): p. 453-62.
122. Segundo, D.S., et al., *Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in renal transplant recipients*. Transplantation, 2006. **82**(4): p. 550-7.
123. Wang, Z., et al., *Low-dose of tacrolimus favors the induction of functional CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells in solid-organ transplantation*. Int Immunopharmacol, 2009. **9**(5): p. 564-9.
124. Salomon, B., et al., *B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes*. Immunity, 2000. **12**(4): p. 431-40.
125. 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.
126. Vincenti, F., et al., *Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation*. N Engl J Med, 2005. **353**(8): p. 770-81.
127. Furuzawa-Carballeda, J., et al., *High levels of IDO-expressing CD16+ peripheral cells, and Tregs in graft biopsies from kidney transplant recipients under belatacept treatment*. Transplant Proc, 2010. **42**(9): p. 3489-96.
128. Furuzawa-Carballeda, J., et al., *Infiltrating cellular pattern in kidney graft biopsies translates into forkhead box protein 3 up-regulation and p16INK4 α senescence protein down-regulation in patients treated with belatacept compared to cyclosporin A*. Clin Exp Immunol, 2012. **167**(2): p. 330-7.
129. Furuzawa-Carballeda, J., et al., *Immunophenotyping of peripheral immunoregulatory as well as Th17A and Th22 cell subpopulations in kidney transplant recipients under belatacept or cyclosporine treatment*. Transpl Immunol, 2014. **30**(2-3): p. 107-13.
130. Chavez, H., et al., *Absence of CD4CD25 regulatory T cell expansion in renal transplanted patients treated in vivo with Belatacept mediated CD28-CD80/86 blockade*. Transpl Immunol, 2007. **17**(4): p. 243-8.
131. Bluestone, J.A., et al., *The effect of costimulatory and interleukin 2 receptor blockade on regulatory T cells in renal transplantation*. Am J Transplant, 2008. **8**(10): p. 2086-96.
132. Grimbert, P., et al., *T-cell phenotype in protocol renal biopsy from transplant recipients treated with belatacept-mediated co-stimulatory blockade*. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association, 2011. **26**(3): p. 1087-93.
133. Lopez, M., et al., *A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(10): p. 2844-53.
134. Strauss, L., et al., *Selective survival of naturally occurring human CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells cultured with rapamycin*. J Immunol, 2007. **178**(1): p. 320-9.
135. Ekong, U.D., et al., *Successful resolution of inflammation and increased regulatory T cells in sirolimus-treated post-transplant allograft hepatitis*. Pediatr Transplant, 2012. **16**(2): p. 165-75.

136. Tang, Q., et al., *Altered balance between effector T cells and FOXP3+ HELIOS+ regulatory T cells after thymoglobulin induction in kidney transplant recipients*. *Transpl Int*, 2012. **25**(12): p. 1257-67.
137. 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.
138. 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.
139. 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.
140. 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.
141. Mandapathil, M., et al., *Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression*. *J Immunol Methods*, 2009. **346**(1-2): p. 55-63.
142. Wang, R., et al., *Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3+ regulatory T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(32): p. 13439-44.
143. Kleinewietfeld, M., et al., *CD49d provides access to "untouched" human Foxp3+ Treg free of contaminating effector cells*. *Blood*, 2009. **113**(4): p. 827-36.
144. Salgado, F.J., et al., *CD26: a negative selection marker for human Treg cells*. *Cytometry A*, 2012. **81**(10): p. 843-55.
145. Xia, G., M. Shah, and X. Luo, *Prevention of allograft rejection by amplification of Foxp3(+)/CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells*. *Transl Res*, 2009. **153**(2): p. 60-70.
146. 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.
147. Tresoldi, E., et al., *Stability of human rapamycin-expanded CD4+CD25+ T regulatory cells*. *Haematologica*, 2011. **96**(9): p. 1357-65.
148. 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.
149. Tang, Q. and F. Vincenti, *Transplant trials with Tregs: perils and promises*. *J Clin Invest*, 2017. **127**(7): p. 2505-2512.
150. Miyara, M., et al., *Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus*. *J Immunol*, 2005. **175**(12): p. 8392-400.
151. Viglietta, V., et al., *Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis*. *J Exp Med*, 2004. **199**(7): p. 971-9.
152. Flores-Borja, F., et al., *Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(49): p. 19396-401.
153. Akimova, T., et al., *Differing effects of rapamycin or calcineurin inhibitor on T-regulatory cells in pediatric liver and kidney transplant recipients*. *Am J Transplant*, 2012. **12**(12): p. 3449-61.
154. Hendriks, T.K., et al., *End-stage renal failure and regulatory activities of CD4+CD25bright+FoxP3+ T-cells*. *Nephrol Dial Transplant*, 2009. **24**(6): p. 1969-78.
155. Dons, E.M., et al., *Induced regulatory T cells: mechanisms of conversion and suppressive potential*. *Hum Immunol*, 2012. **73**(4): p. 328-34.
156. Tone, Y., et al., *Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(2): p. 194-202.
157. Aghdasi, B., et al., *FKBP12, the 12-kDa FK506-binding protein, is a physiologic regulator of the cell cycle*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(5): p. 2425-30.
158. Yamaguchi, T., et al., *FKBP12 functions as an adaptor of the Smad7-Smurf1 complex on activin type I receptor*. *J Mol Endocrinol*, 2006. **36**(3): p. 569-79.

159. Xiao, S., et al., *Retinoic acid increases Foxp3+ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF-beta-driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression.* J Immunol, 2008. **181**(4): p. 2277-84.
160. Hill, J.A., et al., *Retinoic acid enhances Foxp3 induction indirectly by relieving inhibition from CD4+CD44hi Cells.* Immunity, 2008. **29**(5): p. 758-70.
161. Lu, L., et al., *All-trans retinoic acid promotes TGF-β-induced Tregs via histone modification but not DNA demethylation on Foxp3 gene locus.* PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24590.
162. Scalapino, K.J., et al., *Suppression of disease in New Zealand Black/New Zealand White lupus-prone mice by adoptive transfer of ex vivo expanded regulatory T cells.* J Immunol, 2006. **177**(3): p. 1451-9.
163. Tang, Q., et al., *In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes.* J Exp Med, 2004. **199**(11): p. 1455-65.
164. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific.* J Immunol, 2000. **164**(1): p. 183-90.
165. Masteller, E.L., et al., *Expansion of functional endogenous antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from nonobese diabetic mice.* J Immunol, 2005. **175**(5): p. 3053-9.
166. 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.
167. Veerapathran, A. and J. Pidala, *Ex vivo expansion of human Tregs specific for alloantigens presented directly or indirectly.* 2011. **118**(20): p. 5671-80.
168. Cheraï, M., et al., *Generation of Human Alloantigen-Specific Regulatory T Cells Under Good Manufacturing Practice-Compliant Conditions for Cell Therapy.* Cell Transplant, 2015. **24**(12): p. 2527-40.
169. 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.
170. Moser, M., *Dendritic cells in immunity and tolerance-do they display opposite functions?* Immunity, 2003. **19**(1): p. 5-8.
171. Fujii, S., et al., *The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation.* J Exp Med, 2004. **199**(12): p. 1607-18.
172. Jonuleit, H., et al., *Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells.* J Exp Med, 2000. **192**(9): p. 1213-22.
173. Kushwah, R. and J. Hu, *Role of dendritic cells in the induction of regulatory T cells.* Cell Biosci, 2011. **1**: p. 20.
174. Raker, V.K., M.P. Domogalla, and K. Steinbrink, *Tolerogenic Dendritic Cells for Regulatory T Cell Induction in Man.* Front Immunol, 2015. **6**.
175. Osugi, Y., S. Vuckovic, and D.N. Hart, *Myeloid blood CD11c(+) dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells differ in their ability to stimulate T lymphocytes.* Blood, 2002. **100**(8): p. 2858-66.
176. Litjens, N.H., et al., *Allogeneic Mature Human Dendritic Cells Generate Superior Alloreactive Regulatory T Cells in the Presence of IL-15.* J Immunol, 2015. **194**(11): p. 5282-93.
177. Banerjee, D.K., et al., *Expansion of FOXP3(high) regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients.* Blood, 2006. **108**(8): p. 2655-61.
178. Cools, N., et al., *Immunosuppression induced by immature dendritic cells is mediated by TGF-beta/IL-10 double-positive CD4+ regulatory T cells.* J Cell Mol Med, 2008. **12**(2): p. 690-700.

179. Caballero, A., et al., *Tolerogenic response: allorecognition pathways*. *Transpl Immunol*, 2006. **17**(1): p. 3-6.
180. 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.
181. 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.
182. Haribhai, D., et al., *A central role for induced regulatory T cells in tolerance induction in experimental colitis*. *J Immunol*, 2009. **182**(6): p. 3461-8.
183. Huang, H., et al., *Comparison of induced versus natural regulatory T cells of the same TCR specificity for induction of tolerance to an environmental antigen*. *J Immunol*, 2013. **191**(3): p. 1136-43.
184. Josefowicz, S.Z., et al., *Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation*. *Nature*, 2012. **482**(7385): p. 395-9.
185. Samstein, R.M., et al., *Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict*. *Cell*, 2012. **150**(1): p. 29-38.
186. 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.
187. Hsu, P., et al., *Altered decidual DC-SIGN+ antigen-presenting cells and impaired regulatory T-cell induction in preeclampsia*. *Am J Pathol*, 2012. **181**(6): p. 2149-60.
188. Maganto-García, E., et al., *Foxp3+-inducible regulatory T cells suppress endothelial activation and leukocyte recruitment*. *J Immunol*, 2011. **187**(7): p. 3521-9.
189. Zheng, S.G., J. Wang, and D.A. Horwitz, *Cutting edge: Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF-beta are resistant to Th17 conversion by IL-6*. *J Immunol*, 2008. **180**(11): p. 7112-6.
190. Huter, E.N., et al., *Cutting edge: antigen-specific TGF beta-induced regulatory T cells suppress Th17-mediated autoimmune disease*. *J Immunol*, 2008. **181**(12): p. 8209-13.
191. Kong, N., et al., *Antigen-specific transforming growth factor beta-induced Treg cells, but not natural Treg cells, ameliorate autoimmune arthritis in mice by shifting the Th17/Treg cell balance from Th17 predominance to Treg cell predominance*. *Arthritis Rheum*, 2012. **64**(8): p. 2548-58.
192. Lutz, J., K. Thurmel, and U. Heemann, *Anti-inflammatory treatment strategies for ischemia/reperfusion injury in transplantation*. *J Inflamm (Lond)*, 2010. **7**: p. 27.
193. Inomata, T., et al., *Impaired Function of Peripherally Induced Regulatory T Cells in Hosts at High Risk of Graft Rejection*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 39924.
194. Xu, W., et al., *Adoptive Transfer of Induced-Treg Cells Effectively Attenuates Murine Airway Allergic Inflammation*. *PLoS One*, 2012. **7**(7).
195. Shi, Q., et al., *CD4+ Foxp3+ regulatory T cells induced by TGF-beta, IL-2 and all-trans retinoic acid attenuate obliterative bronchiolitis in rat trachea transplantation*. *Int Immunopharmacol*, 2011. **11**(11): p. 1887-94.
196. Takasato, F., et al., *Prevention of Allogeneic Cardiac Graft Rejection by Transfer of Ex Vivo Expanded Antigen-Specific Regulatory T-Cells*. *PLoS One*, 2014. **9**(2).
197. Xu, A., Y. Liu, and W. Chen, *TGF-beta-Induced Regulatory T Cells Directly Suppress B Cell Responses through a Noncytotoxic Mechanism*. 2016. **196**(9): p. 3631-41.
198. Liao, T., et al., *In Vivo Attenuation of Antibody-Mediated Acute Renal Allograft Rejection by Ex Vivo TGF-beta-Induced CD4(+)Foxp3(+) Regulatory T Cells*. *Front Immunol*, 2017. **8**.
199. Yue, X., et al., *Control of Foxp3 stability through modulation of TET activity*. *J Exp Med*, 2016. **213**(3): p. 377-97.
200. 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.

201. Wang, J., T.W.J. Huizinga, and R.E.M. Toes, *De novo generation and enhanced suppression of human CD4+CD25+ regulatory T cells by retinoic acid*. J Immunol, 2009. **183**(6): p. 4119-26.
202. Hippen, K., et al., *Generation and large-scale expansion of human inducible regulatory T cells that suppress graft-versus-host disease*. Am J Transplant, 2011. **11**(6): p. 1148-57.
203. Hsu, P., et al., *IL-10 Potentiates Differentiation of Human Induced Regulatory T Cells via STAT3 and Foxo1*. J Immunol, 2015. **195**(8): p. 3665-74.
204. Schmidt, A., et al., *Comparative Analysis of Protocols to Induce Human CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells by Combinations of IL-2, TGF-beta, Retinoic Acid, Rapamycin and Butyrate*. PLoS One, 2016. **11**(2).
205. Candia, E., *Single and combined effect of retinoic acid and rapamycin modulate the generation, activity and homing potential of induced human regulatory T cells*. 2017. **12**(7).
206. Walker, M.R., et al., *De novo generation of antigen-specific CD4(+)CD25(+) regulatory T cells from human CD4(+)CD25(-) cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(11): p. 4103-8.
207. Tu, W., et al., *Efficient generation of human alloantigen-specific CD4+ regulatory T cells from naive precursors by CD40-activated B cells*. Blood, 2008. **112**(6): p. 2554-62.
208. 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.
209. Di Ianni, M., et al., *Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation*. Blood, 2011. **117**(14): p. 3921-8.
210. 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.
211. 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.
212. Marek-Trzonkowska, N., et al., *Therapy of type 1 diabetes with CD4(+)CD25(high)CD127-regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets - results of one year follow-up*. Clin Immunol, 2014. **153**(1): p. 23-30.
213. Safinia, N., et al., *Successful expansion of functional and stable regulatory T cells for immunotherapy in liver transplantation*. Oncotarget, 2016. **7**(7): p. 7563-77.
214. 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.
215. Qin, S., et al., *The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions*. Journal of Clinical Investigation, 1998. **101**(4): p. 746-754.
216. Hoerning, A., et al., *Peripherally circulating CD4(+) FOXP3(+) CXCR3(+) T regulatory cells correlate with renal allograft function*. Scand J Immunol, 2012. **76**(3): p. 320-8.
217. Lapierre, P., et al., *Adoptive transfer of ex vivo expanded regulatory T cells in an autoimmune hepatitis murine model restores peripheral tolerance*. Hepatology, 2013. **57**(1): p. 217-227.
218. Banham, A.H., *Cell-surface IL-7 receptor expression facilitates the purification of FOXP3(+) regulatory T cells*. Trends in immunology, 2006. **27**(12): p. 541-4.
219. Floess, S., et al., *Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells*. PLoS Biol, 2007. **5**(2): p. e38.
220. Pilat, N. and T. Wekerle, *Belatacept and Tregs: friends or foes?* Immunotherapy, 2012. **4**(4): p. 351-4.

221. De Serres, S.A., et al., *Effect of biologic agents on regulatory T cells*. *Transplant Rev (Orlando)*, 2011. **25**(3): p. 110-6.
222. 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.
223. Vondran, F.W.R., et al., *Decreased frequency of peripheral CD4(+) CD161(+) Th(17) - precursor cells in kidney transplant recipients on long-term therapy with Belatacept*. *Transpl Int*, 2012. **25**(4): p. 455-63.
224. Allan, S.E., et al., *Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production*. *Int Immunol*, 2007. **19**(4): p. 345-54.
225. Valujskikh, A. and X.C. Li, *Frontiers in nephrology: T cell memory as a barrier to transplant tolerance*. *J Am Soc Nephrol*, 2007. **18**(8): p. 2252-61.
226. Li, R., et al., *Enhanced engagement of CTLA-4 induces antigen-specific CD4+CD25+Foxp3+ and CD4+CD25- TGF-beta 1+ adaptive regulatory T cells*. *J Immunol*, 2007. **179**(8): p. 5191-203.
227. Zheng, S.G., et al., *TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells*. *J Immunol*, 2006. **176**(6): p. 3321-9.
228. Mantel, P.-Y., et al., *Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells*. *J Immunol*, 2006. **176**(6): p. 3593-602.
229. Huynh, A., R. Zhang, and L.A. Turka, *Signals and pathways controlling regulatory T cells*. *Immunol Rev*, 2014. **258**(1): p. 117-31.
230. Mahmud, S.A., L.S. Manlove, and M.A. Farrar, *Interleukin-2 and STAT5 in regulatory T cell development and function*. *JAKSTAT*, 2013. **2**(1): p. e23154.
231. Miyara, M., et al., *Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor*. *Immunity*, 2009. **30**(6): p. 899-911.
232. Booth, N.J., et al., *Different proliferative potential and migratory characteristics of human CD4+ regulatory T cells that express either CD45RA or CD45RO*. *J Immunol*, 2010. **184**(8): p. 4317-26.
233. 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.
234. Zabransky, D.J., et al., *Phenotypic and functional properties of Helios+ regulatory T cells*. *PLoS One*, 2012. **7**(3): p. e34547.
235. Chauhan, S.K., et al., *Levels of Foxp3 in regulatory T cells reflect their functional status in transplantation*. *J Immunol*, 2009. **182**(1): p. 148-53.
236. Yagi, H., et al., *Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells*. *Int Immunol*, 2004. **16**(11): p. 1643-56.
237. Sojka, D.K. and D.J. Fowell, *Regulatory T cells inhibit acute IFN-gamma synthesis without blocking T-helper cell type 1 (Th1) differentiation via a compartmentalized requirement for IL-10*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(45): p. 18336-41.
238. Schmidt, A., N. Oberle, and P.H. Krammer, *Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression*. *Front Immunol*, 2012. **3**: p. 51.
239. Shevach, E.M. and A.M. Thornton, *tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences*. *Immunol Rev*, 2014. **259**(1): p. 88-102.
240. Tapirdamaz, O., et al., *Detailed kinetics of the direct allo-response in human liver transplant recipients: new insights from an optimized assay*. *PLoS One*, 2010. **5**(12): p. e14452.
241. Baker, R.J., et al., *Loss of Direct and Maintenance of Indirect Alloresponses in Renal Allograft Recipients: Implications for the Pathogenesis of Chronic Allograft Nephropathy*. *The Journal of Immunology*, 2001. **167**(12): p. 7199-7206.

242. Marelli-Berg, F.M., et al., *Antigen presentation by epithelial cells induces anergic immunoregulatory CD45RO+ T cells and deletion of CD45RA+ T cells*. J Immunol, 1997. **159**(12): p. 5853-61.
243. Ng, W.F., et al., *Reversibility with interleukin-2 suggests that T cell anergy contributes to donor-specific hyporesponsiveness in renal transplant patients*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(12): p. 2983-9.
244. Wells, A.D., et al., *Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance*. Nat Med, 1999. **5**(11): p. 1303-7.
245. Li, X.C., et al., *On Histocompatibility Barriers, Th1 to Th2 Immune Deviation, and the Nature of the Allograft Responses()*. J Immunol, 1998. **161**(5): p. 2241-7.
246. Li, X. and Y. Zheng, *Regulatory T cell identity: formation and maintenance*. Trends Immunol, 2015. **36**(6): p. 344-53.
247. van Loosdregt, J. and P.J. Coffey, *Post-translational modification networks regulating FOXP3 function*. Trends Immunol, 2014. **35**(8): p. 368-78.
248. Toker, A., et al., *Active demethylation of the Foxp3 locus leads to the generation of stable regulatory T cells within the thymus*. J Immunol, 2013. **190**(7): p. 3180-8.
249. Wicczorek, G., et al., *Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue*. Cancer Res, 2009. **69**(2): p. 599-608.
250. Camperio, C., et al., *Forkhead transcription factor FOXP3 upregulates CD25 expression through cooperation with RelA/NF-kappaB*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e48303.
251. Read, S., et al., *Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4376-83.
252. Yang, R., et al., *Hydrogen Sulfide Promotes Tet1- and Tet2-Mediated Foxp3 Demethylation to Drive Regulatory T Cell Differentiation and Maintain Immune Homeostasis*. Immunity, 2015. **43**(2): p. 251-63.
253. Nair, V.S. and K.I. Oh, *Down-regulation of Tet2 prevents TSDR demethylation in IL2 deficient regulatory T cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **450**(1): p. 918-24.
254. Thomas, R.M., L. Gao, and A.D. Wells, *Signals from CD28 induce stable epigenetic modification of the IL-2 promoter*. J Immunol, 2005. **174**(8): p. 4639-46.
255. 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.
256. Sugimoto, N., et al., *Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis*. Int Immunol, 2006. **18**(8): p. 1197-209.
257. Long, S.A., et al., *Defects in IL-2R signaling contribute to diminished maintenance of FOXP3 expression in CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells of type 1 diabetic subjects*. Diabetes, 2010. **59**(2): p. 407-15.
258. Leibler, C., et al., *Kidney transplant recipients treated with belatacept exhibit increased naïve and transitional B cells*. Am J Transplant, 2014. **14**(5): p. 1173-82.
259. Veerapathran, A., et al., *Ex vivo expansion of human Tregs specific for alloantigens presented directly or indirectly*. Blood, 2011. **118**(20): p. 5671-80.
260. Leon, B. and C. Ardavin, *Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity*. Immunol Cell Biol, 2008. **86**(4): p. 320-4.
261. Leon, B., M. Lopez-Bravo, and C. Ardavin, *Monocyte-derived dendritic cells*. Semin Immunol, 2005. **17**(4): p. 313-8.
262. Mahnke, K., et al., *Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells*. Immunol Cell Biol, 2002. **80**(5): p. 477-83.
263. Chapuis, F., et al., *Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro*. Eur J Immunol, 1997. **27**(2): p. 431-41.
264. Zheng, J., et al., *CD40-activated B cells are more potent than immature dendritic cells to induce and expand CD4(+) regulatory T cells*. Cell Mol Immunol, 2010. **7**(1): p. 44-50.

265. Yao, Z., et al., *Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3*. *Blood*, 2007. **109**(10): p. 4368-75.
266. Turner, M.S., L.P. Kane, and P.A. Morel, *Dominant role of antigen dose in CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cell induction and expansion*. *J Immunol*, 2009. **183**(8): p. 4895-903.
267. Sela, U., et al., *Dendritic cells induce antigen-specific regulatory T cells that prevent graft versus host disease and persist in mice*. *J Exp Med*, 2011. **208**(12): p. 2489-96.
268. Rodriguez-Garcia, M., et al., *Human immature monocyte-derived dendritic cells produce and secrete alpha-defensins 1-3*. *J Leukoc Biol*, 2007. **82**(5): p. 1143-6.
269. Elkord, E., et al., *Human monocyte isolation methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells*. *Immunology*, 2005. **114**(2): p. 204-12.
270. Camperio, C., et al., *Forkhead Transcription Factor FOXP3 Upregulates CD25 Expression through Cooperation with RelA/NF- κ B*. *PLoS One*, 2012. **7**(10).
271. Chatterjee, A., et al., *Rapamycin-induced G1 cell cycle arrest employs both TGF-beta and Rb pathways*. *Cancer Lett*, 2015. **360**(2): p. 134-40.
272. Lu, L., et al., *All-trans retinoic acid promotes TGF-beta-induced Tregs via histone modification but not DNA demethylation on Foxp3 gene locus*. *PLoS One*, 2011. **6**(9): p. e24590.
273. Sagoo, P., *Human Regulatory T Cells with Alloantigen Specificity Are More Potent Inhibitors of Alloimmune Skin Graft Damage than Polyclonal Regulatory T Cells*. 2011. **3**(83): p. 83ra42.
274. 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.
275. Zorn, E., et al., *IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo*. *Blood*, 2006. **108**(5): p. 1571-9.
276. Strauss, L., et al., *Differential Responses of Human Regulatory T Cells (Treg) and Effector T Cells to Rapamycin*. *PLoS One*, 2009. **4**(6).
277. Delgoffe, G.M., et al., *The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(4): p. 295-303.
278. Sarbassov, D.D., et al., *Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB*. *Mol Cell*, 2006. **22**(2): p. 159-68.
279. Delgoffe, G.M., et al., *mTOR differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment*. *Immunity*, 2009. **30**(6): p. 832-44.
280. Shen, H. and D.R. Goldstein, *IL-6 and TNF- α Synergistically Inhibit Allograft Acceptance*. *J Am Soc Nephrol*, 2009. **20**(5): p. 1032-40.
281. Nie, H., et al., *Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF-alpha in rheumatoid arthritis*. *Nat Med*, 2013. **19**(3): p. 322-8.
282. Kimura, A. and T. Kishimoto, *IL-6: regulator of Treg/Th17 balance*. *Eur J Immunol*, 2010. **40**(7): p. 1830-5.
283. Valencia, X., et al., *TNF downmodulates the function of human CD4(+)CD25(hi) T-regulatory cells*. *Blood*, 2006. **108**(1): p. 253-61.
284. Zhang, Q., et al., *TNF-alpha impairs differentiation and function of TGF-beta-induced Treg cells in autoimmune diseases through Akt and Smad3 signaling pathway*. *J Mol Cell Biol*, 2013. **5**(2): p. 85-98.
285. Wing, K., et al., *CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function*. *Science*, 2008. **322**(5899): p. 271-5.
286. 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.

287. Koenecke, C., et al., *IFN-gamma production by allogeneic Foxp3+ regulatory T cells is essential for preventing experimental graft-versus-host disease*. J Immunol, 2012. **189**(6): p. 2890-6.
288. Wang, Z., et al., *Role of IFN-gamma in induction of Foxp3 and conversion of CD4+ CD25- T cells to CD4+ Tregs*. J Clin Invest, 2006. **116**(9): p. 2434-41.
289. Nishibori, T., et al., *Impaired development of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the absence of STAT1: increased susceptibility to autoimmune disease*. J Exp Med, 2004. **199**(1): p. 25-34.
290. Zhang, P., et al., *Induced regulatory T cells promote tolerance when stabilized by rapamycin and IL-2 in vivo*. J Immunol, 2013. **191**(10): p. 5291-303.
291. Candia, E., et al., *Single and combined effect of retinoic acid and rapamycin modulate the generation, activity and homing potential of induced human regulatory T cells*. 2017. **12**(7): p. e0182009.
292. Schmidt, A., et al., *Comparative Analysis of Protocols to Induce Human CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells by Combinations of IL-2, TGF-beta, Retinoic Acid, Rapamycin and Butyrate*. PLoS One, 2016. **11**(2): p. e0148474.
293. Gu, J., et al., *TGF-β-induced CD4(+)Foxp3(+) T cells attenuate acute graft-versus-host disease via suppressing expansion and killing of effector CD8+ cells*. J Immunol, 2014. **193**(7): p. 3388-97.
294. Lee, J.H., J.P. Lydon, and C.H. Kim, *Progesterone suppresses the mTOR pathway and promotes generation of induced regulatory T cells with increased stability*. Eur J Immunol, 2012. **42**(10): p. 2683-96.
295. Chen, Q., et al., *IL-2 Controls the Stability of Foxp3 expression in TGF-β-induced Foxp3(+) T cells in vivo*. J Immunol, 2011. **186**(11): p. 6329-37.
296. 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*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 748.