



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DE LA IL-15 EN LA EXPANSIÓN
EX VIVO EN EL FENOTIPO SUPRESOR DE
CÉLULAS T REGULADORAS
ALOESPECÍFICAS CON POTENCIAL
TERAPÉUTICO EN TRASPLANTE RENAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

KATYA ROSAS CORTINA

TUTOR(A)

DRA. MARÍA GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO



Ciudad Universitaria, CD. MX. 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Dra. Paula Licona Limón

VOCAL: Profesor: Dr. Enrique Ortega Soto

SECRETARIO: Profesor: Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo

1º SUPLENTE: Profesor: Dra. Janette Furuzawa Carballeda

2º SUPLENTE: Profesor: Evelyn Katy Alvarez Salazar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO # 107 DEL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA DEL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS (IIB) DE LA UNIVERSIDAD
NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

DRA. María Gloria Soldevila Melgarejo

SUSTENTANTE:

Katya Rosas Cortina

El financiamiento de este estudio fue concedido por el programa CONACyT-FORDECYT #302815 (Pronace-Salud).

“No se puede pasar un solo día sin tener un impacto en el mundo que nos rodea. Lo que hacemos marca la diferencia, y tenemos que decidir qué tipo de diferencia queremos hacer.”

Jane Goodall

Agradecimientos

A la Dra. Gloria Soldevila por recibirme en su laboratorio y por sus asesorías en esta tesis.

A la Dra. Paula Licon Limón, al Dr. Enrique Ortega Soto, a la Dra. Janette Furuzawa Carballeda y a la Dra. Evelyn Katy Alvarez Salazar por sus valiosas observaciones y aportaciones a este trabajo.

A la Facultad de Ciencias por aceptarme en sus aulas y por formarme como una profesionalista en el área científica.

Al Dr. Arimelek Cortés por ser mi asesor en este trabajo, por su tiempo, su paciencia, su dedicación y el conocimiento que me brindó.

Al Dr. Saúl Arteaga por la ayuda y el conocimiento que me proporcionó durante mi estancia en el laboratorio.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas por recibirme en uno de sus laboratorios de investigación.

Al programa CONACyT-FORDECYT por el apoyo recibido para la realización de este trabajo.

Al Laboratorio Nacional de Citometría por las capacitaciones, por la oportunidad de realizar los análisis de esta tesis en sus instalaciones y a todo el personal del mismo.

Dedicatorias

Esta tesis está dedicada a:

A mis padres José Leonardo Rosas y Eva Cortina quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más. Les agradezco por siempre apoyarme en cada una de mis decisiones más difíciles y por motivarme para seguir superándome todos los días. Gracias por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este.

A mi hermana Estefania Leonor Rosas Cortina por su amor, cariño y apoyo incondicional durante este proceso, por estar conmigo en todo momento y por enseñarme a tu modo cuando algo se me dificultaba en mi vida profesional, gracias. Quiero que sepas que mis logros también son los tuyos. Siempre estaré para ti.

En memoria de mi tía Martha Cortina y de mi abuelito Cipriano Cortina que donde quiera que estén, sé que están orgullosos de mi.

En memoria de Mochi que fuiste un ser que en tan poco tiempo se volvió mi alegría para salir adelante, específicamente durante la pandemia, además de ayudarme mucho con mi estabilidad mental.

En memoria del Mtro. Adhemar Liquitaya que me enseñó la valiosa lección de siempre compartir el conocimiento que he adquirido.

A mi abuelita Guadalupe Martínez. A mis tías, Rosalina Cortina y Elizabeth Cortina, a mis tios Juan Rosas, Gabriel Cortina y Elias Cortina, A mis primos Nadia, Gabriel, Juan, Moises y José.

A Mariana Perea por ser mi mejor amiga desde la secundaria, por escucharme, por su apoyo y siempre darme ánimos para continuar. Gracias por tantos bonitos momentos.

A Alexandra Morales por ser mi mejor amiga durante la carrera, jamás voy a olvidar todos los momentos tan divertidos, y difíciles que pasamos juntas. Gracias por escucharme cuando más lo necesitaba.

A Arianna Ortega que a pesar de llevar poco tiempo de ser amigas, te has vuelto una persona muy apreciada para mí. Gracias por tantas risas, pláticas, tiempo y paciencia en las prácticas de campo.

A Iván Lugo por ser mi mejor amigo desde nuestras clases de japonés, por escucharme y siempre ayudarme con asuntos académicos.

A mis amigos de CCH Minerva Soto, Fernanda Esquivel, Aaron Alonso, Alma Rojas, Allyson Aguilar, Veronica Luna, Gala Corona y Selene Díaz, que siguen siendo mis amigos. Les doy las gracias por los buenos momentos y consejos.

A Jorge Manuel Pérez por la gran amistad que tenemos y que espero sea para toda la vida.

A mis amigos de la universidad Amanda Arana, Romina Ojeda, Ravel Ojeda, Johanna, Gema Pérez, Marisol Segundo, Ivone Flores, Bone Orozco, Kevin, Álvaro, Sandra Esparza y Sharon.

A mis amigas de la secu Andrea Alcaráz, Mónica Alcaráz y Cielo Luna, que a pesar del tiempo, aún seguimos en contacto y deseándonos siempre lo mejor.

A mis amigos que conocí en Canadá, Koh Min Jung, Min Joo, Oh Hyeon Min, Kim Kyung Hee, Sung Min, Karina, Soo Yeon, Beatriz, Valeria y Alberto, muchas gracias por mostrarme que el mundo es más grande de lo que parece, por cuidarme, por su amistad, por su cariño y valiosas lecciones de vida.

Al Dr. Arimelek por ayudarme a dar mis primeros pasos en el laboratorio, por ser un gran profesor, por su dedicación y por la gran paciencia que tuvo con mi persona en todo el proceso de la tesis.

Al Dr. Saúl y a la Dra. Sandra que me recibieron de la manera más amable en el laboratorio, por su enseñanza y grandes consejos para poder mejorar cada día más como alumna.

Índice

I. Índice de tablas	3
II. Índice de figuras.....	3
III. Abreviaturas.....	4
1. Resumen.....	1
2. Introducción	1
2.1 Inmunología del Trasplante	1
2.1.1. Sistema Inmune Adaptativo en la respuesta inmunitaria al aloinjerto.....	3
2.2 Fármacos inmunosupresores en el TR: ventajas y efectos adversos	4
2.3 Células T reguladoras	5
2.3.1. Regulación Transcripcional y Epigenética de FOXP3	6
2.3.2. Participación de IL-15 en la homeostasis de las células Tregs	7
2.3.3. Mecanismo de supresión de Tregs.....	9
2.3.4. Receptores de quimiocinas presentes en las células Tregs	11
2.4. Células Tregs en la tolerancia al trasplante renal	12
2.3. Antecedentes directos	14
2.3.1 Retos actuales de la inmunoterapia con Tregs en humanos.....	14
4. Justificación	17
5. Hipótesis	18
6. Objetivo general.....	18
7. Objetivos particulares	18
8. Metodología	18
8.1. Población de estudio	18
8.2 Materiales y reactivos	19
8.3. Separación y criopreservación de células mononucleares de sangre periférica	19
8.4. Diferenciación y caracterización de células dendríticas derivadas de monocitos (CDs-mo)	20
8.5. Purificación de células Tregs	21
8.6. Aislamiento y expansión <i>ex vivo</i> de células Tregs aloespecíficas (Tregs-AE).....	21
8.7. Ensayo de supresión aloantígeno-específico <i>in vitro</i>	22
8.8. Inmunotipificación de células Tregs por citometría de flujo	22

8.9. Análisis estadístico	23
8.9 Diagrama de flujo del diseño experimental	23
9. Resultados	24
9.1. Células dendríticas derivadas de monocitos inducen la proliferación de células T aloespecíficas	24
9.2. IL-2 e IL-15 promueven la proliferación de células Tregs-aloespecíficas CD27 ^{hi}	26
9.3. Células Tregs-AE CD27 ^{hi} tienen mayor expresión de FOXP3 y Helios	29
9.4. Células Tregs-aloespecíficas CD27 ^{hi} expandidas a largo plazo con IL-2 + IL-15 mantienen su fenotipo inmunosupresor	32
9.5. Células Tregs-AE CD27 ^{hi} expandidas suprimen la proliferación de células Tconv de manera aloantígeno-específica.....	36
9.6. La expansión de células Tregs-AE con IL-2 + IL-15 mantiene una alta pureza de CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺	38
10. Discusión	39
11. Conclusiones	46
12. Perspectivas	46
13. Bibliografía	47
14. Anexos	55
14.1. Reactivos.....	55
14.2. Figuras suplementarias	56

I. Índice de tablas

Tabla 1. Moléculas HLA clásicas.....	3
Tabla 2. Células Th y su papel en el trasplante.....	4
Tabla 3. Fármacos inmunosupresores y sus efectos adversos.....	5
Tabla 4. Factores de Transcripción que participan en la transcripción del gen FOXP3	7
Tabla 5. Metodologías de expansión de células Tregs-AE	14
Tabla 6. Pureza de las células Tregs-AE CD27 ^{hi} expandidas.....	38

II. Índice de figuras

Figura 1. Personas que requieren recibir un trasplante en México.....	1
Figura 2. Comparación entre los receptores de IL-2 e IL-15.	8
Figura 3. Mecanismos de supresión de la célula Treg.	10
Figura 4. Receptores de quimiocinas en las células Tregs y quimiocinas presentes en el rechazo del injerto.	11
Figura 5. Diagrama del protocolo experimental de la expansión <i>ex vivo</i> de células Tregs.....	22
Figura 6. Caracterización de células dendríticas derivadas de monocitos generadas <i>in vitro</i>	25
Figura 7. Caracterización de células T CD4 ⁺ CD25 ^{hi} CD127 ⁻ purificadas mediante citometría de flujo.	26
Figura 8. Células dendríticas inducen la proliferación de células Tregs CD27 ^{hi} aloantígeno específicas en presencia de IL-2 e IL-15.	28
Figura 9. Las células Tregs-AE CD27 ^{hi} expresan mayores niveles de FOXP3 y Helios.	30 y 31
Figura 10. Células Tregs-AE CD27 ^{hi} expansión policlonalmente con IL-2 + IL-15 a largo plazo mantienen la expresión de marcadores inmunorreguladores.	33
Figura 11. Células Tregs-AE CD27 ^{hi} expandidas policlonalmente con IL-2 + IL-15 a largo plazo presentan altos niveles de CCR2, CCR4 y CXCR3.	35
Figura 12. Las células Tregs-AE CD27 ^{hi} expandidas <i>ex vivo</i> suprimen la proliferación de células Tconv de manera aloantígeno específica.....	37

III. Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP-1	Proteína Activadora 1
ATRA	Ácido holo-transretinoico
CCR	Receptor de quimiocina C-C
CDs	Células dendríticas
CD	Clúster de diferenciación
CD11c	Proteína transmembranal tipo 1
CD25	Cadena alfa del receptor de la interleucina 2 Alto
CD39	Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa-1
CD86	Cluster de diferenciación 86
CD127	Cadena alfa del receptor de la interleucina 7
CDs-Alo	Células Dendríticas Alogénicas
CDs-Aut	Células dendríticas Autólogas
CFSE	Éster de succinimidil-carboxifluoresceína
CMNs	Células mononucleares
CNS	Secuencias No codificadas Conservadas
CPAs	Células Presentadoras de Antígeno
CTLA-4	Antígeno 4 del linfocito T citotóxico
CTV	CellTrace™ Violet
CXCR	Receptor de quimiocinas con motivos C-X-C
FMO	Fluorescence Minus One Control
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HLA	Antígeno leucocitario humano
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-15	Interleucina 15
IMF	Intensidad mediana de fluorescencia
iTreg	Tregs inducidas <i>in vitro</i>
LAG-3	Gen 3 de activación de linfocitos
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting

MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
min	minutos
MLR	Reacción linfocitaria mixta
mL	mililitros
NFAT	Factor Nuclear de Células T Activadas
ng	nanogramo
Nr4a	Subfamilia de receptores nucleares 4A
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
pTreg	Tregs periféricas
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
rpm	revoluciones por minuto
SFB	Suero Fetal Bovino
SI	Sistema inmune
SH-AB	Suero Humano AB
STAT	Transductor de señales y activador de la transcripción
Tconv	T convencionales
TCR	Receptor de células T
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TR	Trasplante Renal
tTreg	Células T reguladoras derivadas del timo
Treg-AE	Célula T reguladora aloespecífica
Treg-NAE	Célula T reguladora no aloespecífica
Treg-Poli	Célula T reguladora policlonal
U	Unidades

1. Resumen

Las células T reguladoras (Tregs) son una subpoblación de células T CD4⁺ esenciales para establecer y mantener la tolerancia inmunológica, y son caracterizadas por la expresión de FOXP3, un factor de transcripción crucial para sus funciones inmunorreguladoras. Estudios en animales han demostrado que las terapias con células Tregs FOXP3⁺ específicas a aloantígenos (Tregs-AE) inducen tolerancia al aloinjerto y, por lo tanto, serían una alternativa al uso de fármacos inmunosupresores (FI) los cuales a largo plazo tienen efectos adversos en los pacientes con trasplante renal. Debido a que las Tregs-AE son una población muy reducida en sangre periférica (<10% del total de Tregs), es necesario expandirlas *ex vivo* a largo plazo sin afectar sus características inmunorreguladoras. En este contexto, se ha reportado que el empleo de la IL-2 más IL-15 incrementan la proliferación celular de Treg-AE y mantienen la expresión de FOXP3⁺. Adicionalmente, trabajos previos demuestran que después de varios ciclos de expansión las células Tregs CD27^{hi} presentan una mayor capacidad supresora que se correlacionó con el mantenimiento de marcas epigenéticas características de Tregs, en comparación con las Tregs CD27⁻. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la IL-15 sobre la proliferación y el fenotipo inmunorregulador de Tregs-AE CD27^{hi}. Como primer paso, se cocultivaron células Tregs (marcadas con CTV) de individuos sanos con células dendríticas alogénicas derivadas de monocitos en presencia de ácido retinoico e IL-2 con o sin IL-15. Posteriormente, las células Tregs CD4⁺CD25^{hi}CD27^{hi}CTV⁻ (Tregs-AE CD27^{hi}) se purificaron y se expandieron policlonalmente con anti-CD3/-CD28, TGF-β, IL-2 y rapamicina en presencia o ausencia de IL-15. Después de 3 semanas de expansión, las Tregs-AE CD27^{hi} en promedio se expandieron 252 veces con solo IL-2 y 574 veces con IL-2 + IL-15 y, con una pureza >94% (CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺) para ambas condiciones. De manera importante, las células Tregs-AE CD27^{hi} expandidas muestran una alta expresión de Helios, CTLA-4 y CD39, indicando un fenotipo supresor. Además, expresan receptores de quimiocinas incluyendo CCR2, CCR4 y CXCR3. Finalmente, demostramos que las Tregs-AE CD27^{hi} expandidas con IL-2 ± IL-15 exógenas no solo presentan un fenotipo supresor, sino también suprimen la proliferación de células T de manera aloantígeno específica. En conclusión, el aislamiento de células Tregs-AE CD27^{hi} y su posterior expansión con IL-2 + IL-15 permitiría obtener células reguladoras con potencial inmunoterapéutico en el contexto del trasplante alogénico.

2. Introducción

2.1 Inmunología del Trasplante

El trasplante renal (TR) es la terapia de elección para individuos con insuficiencia renal, puesto que mejora la calidad de vida y sobrevida del paciente (1). En México, el riñón es el segundo órgano más trasplantado; tan sólo en el 2020, se llevaron a cabo 905 TRs (2). Además, en 2021 el riñón se mantiene como el órgano con más individuos en lista de espera (Figura 1) (3).

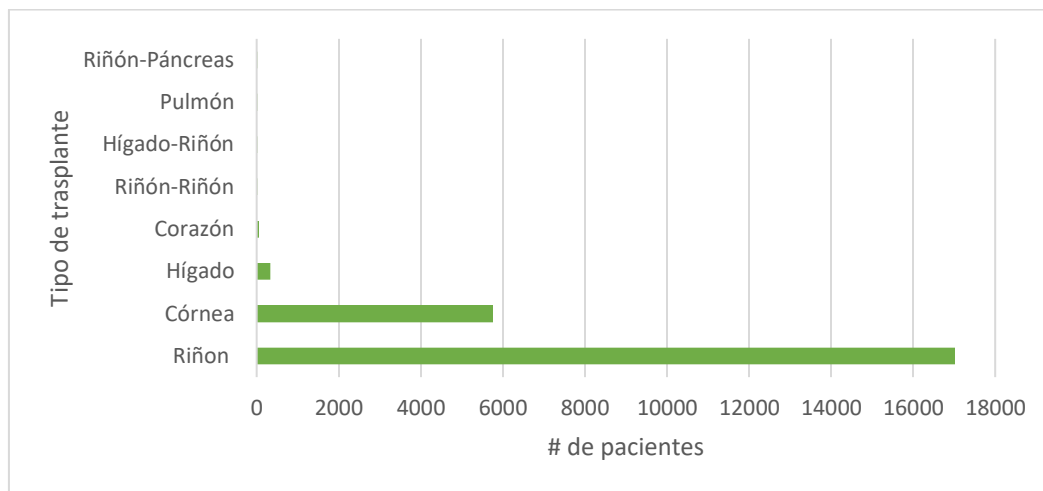


Figura 1. Personas que requieren recibir un trasplante en México. Datos estadísticos del Centro Nacional de Trasplante (CENATRA), corte al segundo trimestre 2021 (3).

Después de realizar el TR, el seguimiento médico es necesario para asegurar su éxito. Sin embargo, pueden surgir diversas complicaciones postoperatorias precoces o tardías (4). El rechazo es la principal complicación y se caracteriza por una respuesta inflamatoria mediada por células del sistema inmunitario (SI) del receptor, con el fin de eliminar el injerto. Se han clasificado tres tipos de rechazo de acuerdo con el tiempo en que ocurre y a las características histopatológicas:

- I. **Hiperagudo:** Ocurre minutos después de la anastomosis del injerto. Se debe a la existencia de anticuerpos anti-donador específicos preformados que reconocen antígenos endoteliales del injerto y generan una trombosis intravascular llevando a una pérdida del TR (5).
- II. **Agudo:** Ocurre comúnmente en los tres primeros meses posterior al TR. Es el resultado de dos mecanismos inmunológicos no mutuamente excluyentes: 1) mecanismo celular mediado por células (o linfocitos) T; 2) mecanismo humoral mediado por anticuerpos producidos por células B (6). Tiene una incidencia <10 % dentro del primer año post-TR, y es la causa de pérdida del injerto en el mismo periodo (7).

III. ***Rechazo crónico o nefropatía crónica del injerto***: Es un deterioro progresivo del TR que puede estar mediado por mecanismos celulares y/o humorales, y es caracterizado por lesiones tubulares, vasculares y glomerulares. Se ha reportado que a 10 años, el 57,9% de los pacientes presentan lesiones en la biopsia renal (5,8) y actualmente es la principal causa de pérdida del injerto a largo plazo.

La prevención del rechazo de trasplantes requiere comprender y modular la respuesta inmunitaria para beneficiar al receptor. El sistema inmunológico del receptor responde de muchas formas a insultos como daño tisular por traumatismo mecánico, isquemia, hipotermia que provoca la liberación de mediadores proinflamatorios solubles (citocinas, histamina, prostaglandina, leucotrienos) y DAMPs. Lo anterior resulta de un aumento de la permeabilidad vascular, vasodilatación y atracción de células presentadoras de antígeno (CPAs) que incluyen las células dendríticas (CDs) y macrófagos. Las CPAs tienen la capacidad de capturar antígenos (obtenidos por fagocitosis o pinocitosis de moléculas solubles, microorganismos o células dañadas), procesarlos y presentarlos en moléculas del MHC I/II a las células T (9). Las CDs son las CPAs por excelencia, debido a su mayor capacidad para inducir la activación y proliferación de células T (10). Por otra parte, el daño tisular incrementa la expresión de proteínas (complejo principal de histocompatibilidad o MHC clase I y II, y moléculas coestimuladoras CD80/CD86) en CDs e induce la migración de las CDs a órganos linfoides secundarios, donde presentan antígenos específicos del aloinjerto (*aloantígenos*) e inducen la activación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ específicos (*aloespecíficos*) del receptor (11). Además, las células como los macrófagos liberan citocinas como IL-1 β y el TNF- α que, junto a las células endoteliales activadas, reclutan en el sitio a los linfocitos T aloespecíficos, los cuales causan daño tisular mediante varios posibles mecanismos no mutuamente excluyentes, incluyendo: daño directo a través de la citotoxicidad específica; modulación de otras células del sistema inmune mediante la producción de citocinas y expresión de moléculas en la superficie celular; inducción de respuestas mediadas por anticuerpos al interactuar con linfocitos B; respuestas de hipersensibilidad, entre otras (12).

Debido a diferencias genéticas entre donador y receptor, existen antígenos expresados específicamente en el aloinjerto que son reconocidos por el SI del receptor (13). Las principales diferencias se encuentran en la región génica que codifica las proteínas del antígeno leucocitario humano (HLA) o MHC, las cuales son glicoproteínas de membrana implicadas en la presentación de antígenos a células T (Tabla 1). Una característica del locus HLA es su elevado polimorfismo, es

decir, variaciones en la secuencia del ADN entre individuo (Tabla 1). Debido a lo anterior, las moléculas del HLA son los principales aloantígenos que son reconocidos específicamente por linfocitos T y B del receptor.

Tabla 1. Moléculas HLA clásicas	
Tipo	Características
HLA clase I	Se expresan en todas las células nucleadas. Presentan antígenos procedentes del catabolismo endógeno a las células T CD8 ⁺ . <i>Subtipos:</i> HLA -A, -B y -C. <i>Número de alelos reportados:</i> 21903 (14).
HLA clase II	Presentan péptidos procesados por vía endosomal a células T CD4 ⁺ . Se expresan en las células presentadoras de antígeno profesionales. <i>Subtipos:</i> HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR. <i>Número de alelos reportados:</i> 8,136 (14).

2.1.1. Sistema Inmune Adaptativo en la respuesta inmunitaria al aloinjerto

Las células B y T han sido implicadas en el rechazo del trasplante de órganos sólidos. Sin embargo, modelos de ratones deficientes de células B demostraron que receptores no aceptaban los aloinjertos a largo plazo (15,16). Por el contrario, la ausencia de células T (17) o su deficiente activación (18) lleva a la aceptación de aloinjertos. Lo anterior sugiere que los linfocitos T, pero no los linfocitos B, son esenciales para inducir el rechazo. Las células T reconocen los aloantígenos mediante tres vías:

- I. Vía directa:** Las CDs del donador presentes en el injerto a la hora del trasplante actúan como “leucocitos pasajeros” y en un contexto proinflamatorio, maduran y migran a órganos linfoides secundarios, donde inducen la diferenciación del receptor de células T.
- II. Vía indirecta:** Las CDs del receptor capturan, procesan y presentan aloantígenos en sus moléculas del MHC I o II a células T CD8⁺ o CD4⁺ (5).
- III. Vía semidirecta:** Las CDs del receptor presentan complejos MHC-péptidos del donador intactos en su membrana adquiridas por contacto célula/célula o por fusión con exosomas (19,20).

Los linfocitos T CD4⁺ tendrían un papel dual y esencial durante la respuesta inmune contra el trasplante. Por una parte, las células T CD4⁺ alorreactivas se diferencian en linfocitos T cooperadoras (Th) inflamatorios (Th1, Th2, Th17, Th9) que tienen un papel preponderante en el rechazo de riñón (21) mediante diversos mecanismos (Tabla 2): primero, modulan la función de diversas células del SII y SIA a través de la producción de citocinas inflamatorias (22); segundo, causan daño directo (citotoxicidad) del aloinjerto mediado por FasL, granzimas y perforinas; tercero, favorecen la

diferenciación de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL) por secreción de citocinas como IL-2 e IFN- γ (21–23); por último, inducen producción de anticuerpos en linfocitos B, los cuales generan el rechazo humoral del aloinjerto (5). Por otro lado, las células T CD4⁺ reguladoras (Tregs) inducen tolerancia al trasplante (ver sección 2.4).

Tabla 2. Células Th y su papel en la respuesta inmunológica contra el trasplante.		
Subtipo	Citocinas	Papel en el trasplante
Th1	IFN- γ , IL-2 e TNF- α	Implicados en la estimulación de la respuesta humoral y la activación de CTL, células NK y macrófagos (24). Tienen actividad citotóxica (21).
Th17	IL-17, IL-22 e IL-6	Reclutan neutrófilos dentro del injerto (25).
Th2	IL-10 e IL-4	Líneas celulares de Th2 transferidas <i>in vivo</i> inducen rechazo a aloinjertos de piel (26) en islotes pancreáticos (27) en ratones.
Th9	IL-9, IL-10 e IL-21	Inducen la maduración de las células B y el reclutamiento de mastocitos que intervienen en la tolerancia al trasplante (28).
Tregs	IL-10, TGF- β	Participan en el proceso de tolerancia y previenen el rechazo del injerto (29) al suprimir células T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ ; además de inhibir las funciones de las CPA, lo que reduce su capacidad de presentación de antígenos y coestimulación (30).

2.2 Fármacos inmunosupresores en el TR: ventajas y efectos adversos

Para prevenir el rechazo, los pacientes con TR son tratados con diversos fármacos inmunosupresores (FI) que actúan en diferentes etapas de la alo-respuesta inmunitaria. Se pueden distinguir dos fases:

- I. Terapia de inducción:** proporciona una potente inmunosupresión durante el periodo perioperatorio, que se mantiene aproximadamente entre uno y seis meses después del TR. Los FI de inducción que se emplean actúan eliminando células T u otros leucocitos mediante anticuerpos, y han permitido la reducción de las tasas de rechazo agudo (31).
- II. Terapia de mantenimiento:** Se basa en la administración de múltiples medicamentos durante el periodo perioperatorio y en la mayoría de los casos se mantiene en toda la fase postoperatoria (32). Dentro de estos FI se incluyen los inhibidores de calcineurina, inhibidores de la vía mTOR, agentes anti-proliferativos y corticosteroides (Tabla 3).

Con el uso de FI, se han disminuido significativamente las tasas de rechazo en el primer año post-TR, permitiendo una supervivencia del paciente y del injerto mayores del 90% (33). No obstante, a largo plazo las tasas de supervivencia del injerto y del paciente disminuyen gradualmente y, después de 5 a 10 años del trasplante, solamente alcanzan el 68% y 48,6%, respectivamente (34). Lo anterior puede deberse a dos principales factores. Primero, los FI no suprimen o eliminan específicamente las células

T alorreactivas que participan en el rechazo crónico del TR. Segundo, el uso prolongado de FI trae consigo efectos adversos en pacientes como una mayor incidencia de infecciones, desarrollo de cáncer, enfermedades cardiovasculares, entre otros (Tabla 3), que son las principales causas de muerte en los receptores de TR (35).

Tabla 3. Fármacos inmunosupresores y sus efectos adversos			
Agente inmunosupresor	Mecanismo de acción	Ejemplo de fármaco	Efectos adversos
Anticuerpos monoclonales	Inducción de apoptosis o lisis de células T	Basiliximab Daclizumab	Reacciones de hipersensibilidad y anafilaxia (36), lesiones hepáticas, dermatitis, neurotoxicidad (37).
Inhibidores de la calcineurina	Inhiben la síntesis de citocinas	Ciclosporina A Tracolimus	Fibrosis intersticial, hipertensión, hiperlipidemia, hiperplasia gingival, neurotoxicidad, alopecia y diabetes mellitus (38)
Inhibidores del mTOR	Inhiben la síntesis de proteínas y el metabolismo	Sirolimus o rapamicina, Everolimus	Leucopenia, trombocitopenia, anemia, mucositis, hiperlipidemia, edemas, y disminución de regeneración de tejidos (39,40)(41).
Agentes antiproliferativos	Inhiben la síntesis de ácidos nucleicos y de citocinas	Azatioprina, Micofenolato de mofetilo	Mielotoxicidad (42), carcinoma (Coghill et al., 2016), efectos tóxicos gastrointestinales/hematológicos (45).
Corticoesteroides	Inhiben la síntesis de citocinas	Prednisona	Daño funcional y estructural de injerto e incremento riesgo cardiovasculares (46).

Por lo anterior, es necesario diseñar terapias que induzcan tolerancia aloespecífica al trasplante. En este contexto, se ha demostrado que las células Tregs, un subconjunto de células T CD4⁺ (representa alrededor del 10%) con capacidad inmunosupresora, son esenciales para prevenir el rechazo del aloinjerto (47). En consecuencia, las células Tregs tendrían un potencial terapéutico para promover la tolerancia del injerto a largo plazo, como una alternativa al uso de FI.

2.3 Células T reguladoras

Los linfocitos o células Tregs son fundamentales para mantener la tolerancia periférica hacia antígenos propios y extraños, y prevenir el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas (autoinmunes, gastrointestinales), inducir tolerancia materno-fetal y al trasplante, así como reparación de tejidos dañados (48,49). Existen diferentes subtipos de células Tregs CD4⁺, las cuales se clasifican de acuerdo a su sitio de desarrollo, expresión de factores de transcripción, secreción de citocinas, entre otras características. De esta manera las principales subpoblaciones de células Tregs son: células Tregs FOXP3⁺ de origen tímico, denominadas tTregs, cuyo desarrollo y función se abordaran en los siguientes párrafos; las células Tregs FOXP3⁺ inducidas en órganos linfoides secundarios periféricos, pTregs; células Tregs inducidas tipo 1, Tr1; células T cooperadoras tipo 3, Th3 (50). Las células

pTregs se desarrollan a partir de células Tnaïve después de la activación del TCR, subóptima estimulación de CD28 y en presencia de TGF- β e IL-2, y esta subpoblación participa en la tolerancia hacia antígenos tanto extraños como propios (51). Las células Tr1 se diferencian a partir de linfocitos T naïve posterior a la estimulación del TCR/CD28 en presencia de IL-10, se caracterizan por la secreción de IL-10 y son importantes para mantener la homeostasis intestinal así como prevenir ciertas enfermedades autoinmunes (52). Los linfocitos Th3 se diferencian a partir de linfocitos Tnaïve después del reconocimiento antigénico en presencia de TGF- β , se caracterizan por la ausencia de FOXP3 y secreción de TGF- β (52). Asimismo, es posible generar Tregs FOXP3⁺ *in vitro* y son nombradas iTregs (53).

Las células tTregs expresan constitutivamente CD25 (cadena alfa del receptor de IL-2) y el factor de transcripción FOXP3, el cual es considerado el factor regulador maestro para el compromiso de linaje celular y su función (48,49). La importancia de FOXP3 se ha evidenciado en estudios *in vitro* e *in vivo*, donde mutaciones puntuales en el gen *Foxp3* resultan en una disminución de la actividad supresora de las células Tregs y el desarrollo de autoinmunidad (49).

El desarrollo de las células tTregs se basa en dos pasos: primero, los timocitos CD4SP inmaduros reciben fuertes señales agonistas a través del TCR/CD28, resultando en aumento de la expresión de IL2R α o CD25, para convertirse en timocitos precursores de Tregs CD25⁺; el segundo paso, independiente del TCR, los precursores de Tregs expresan FOXP3 en respuesta a citocinas como IL-2 e IL-15 (54,55). Además, las moléculas coestimuladoras como el CD28, GITR, OX40 y TNFR2 contribuyen en la expresión de FOXP3 y por ende en la diferenciación de tTregs (56).

2.3.1. Regulación Transcripcional y Epigenética de FOXP3

En el locus del gen *Foxp3* se han descrito cuatro secuencias no codificantes conservadas (CNS0-3), dos promotores (uno de ellos tiene una actividad transcripcional mínima) y dos potenciadores, cuyas funciones son:

- I. **CNS0**: la región se activa en las primeras etapas de la diferenciación de timocitos DP antes de la activación del promotor de *Foxp3* y de la región CNS3, si se elimina completamente, afecta la generación y la estabilidad de la expresión de FOXP3 en las células Tregs (57).
- II. **CNS1**: contiene sitios de unión para factores de transcripción como NFAT, Smad3 y RAR/RXR, fundamentales para la inducción de FOXP3 dependiente de TGF- β (58). La CNS1 es regulada a través de modificaciones permisivas de histonas H3Ac, H4Ac, H3K4me3, H3K4me2; estas

modificaciones se encuentran más enriquecidas en las células tTregs y en las iTregs, en comparación con las células Tconv (59).

- III. CNS2:** es responsable de la estabilidad de FOXP3 en respuesta a la estimulación del TCR (60,61). La importancia de que la región CNS2 se encuentre desmetilada, se debe a que la falta de ello implica que ciertos factores de transcripción que inducen la expresión de FOXP3 no puedan unirse a la región (62). Además de la desmetilación de citosinas, la CNS2 en las células Tregs contiene niveles incrementados de metilación en H3K4 y acetilación de las H3/H4, lo que sugiere que la desmetilación del ADN y las modificaciones permisivas de las histonas generan un estado de cromatina abierta en la secuencia CNS2 que promueven la estabilidad de la expresión de FOXP3 (59).
- IV. CNS3:** promueve la diferenciación de las células tTregs al activar la transcripción de *Foxp3* en los timocitos precursores de Tregs (63). Las células Tregs tienen un enriquecimiento de mono- y di-metilación en H3K4, y estas modificaciones permisivas de las histonas ya que se encuentran incrementadas en las subpoblaciones de timocitos CD4⁺CD8⁺ (doble positivo, DP) y CD4⁺CD8⁻ (CD4SP) (64), lo que sugiere que la CNS3 facilita la apertura del locus de *Foxp3* en los precursores de las células tTregs (59).

Tabla 4. Factores de Transcripción que participan en la transcripción del gen FOXP3

Factores de transcripción	Mecanismos durante la transcripción de FOXP3.
c-Rel	Su unión a CNS3 desencadena la expresión de FOXP3 mediada por el TCR y las señales coestimuladoras. También se une al CNS2 y favorece la desmetilación de citosinas.
Familia Foxo	Involucrados en la regulación de la inducción de FOXP3.
Smad3	Modulan la expresión de FOXP3 uniéndose a CNS1 tras la señalización del TGF-β.
NFAT	Modulan la expresión de FOXP3 uniéndose a CNS2 tras la señalización del TCR.
AP-1	Se une a CNS1 y transactiva la inducción de FOXP3.
STAT5	Su unión a CNS2 junto con la señalización de IL-2 protegen la identidad de las células Treg de otras señales de citocinas y mantienen la transcripción heredable de FOXP3.
Nr4a1-3	Unen el promotor de FOXP3 para inducir la transactivación
Satb1	Se une a estructuras de cromatina cerradas y modifica el estado epigenético del locus FOXP3 a un estado en equilibrio.

2.3.2. Participación de IL-15 en la homeostasis de las células Tregs

La IL-15 humana es una glicoproteína, que se encuentra dentro de la familia de las citocinas cuyos receptores comparten la cadena común del receptor γC, e incluyen IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-

21 (65). Estas citocinas son importantes para regular el desarrollo, homeostasis y función de los linfocitos (66). La IL-15 es considerada una citocina pleiotrópica, porque ejerce más de una acción en múltiples tipos celulares. Por ejemplo, la IL-15 es indispensable para el desarrollo y homeostasis de las células T CD8⁺ de memoria (67), así como en la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células NKs (68,69), y en la diferenciación y supervivencia de las células NKTs (70).

La señalización de la IL-15 inicia cuando se acopla a la proteína de unión de alta afinidad IL-15R α y promueve la señalización a través del complejo de señalización β/γ , desencadenando el reclutamiento de la cinasa Janus 1 (JAK1) y la activación de JAK3 por medio de la cadena γ (71). Una vez activadas, JAK1 y JAK3 fosforilan a las proteínas STAT3 y STAT5 respectivamente (Figura 2) (72). Además, las vías de señalización adicionales activadas por la IL-15 implican la fosforilación de las tirosinas cinasas citoplasmáticas de la familia Src Lck, Fyn y Lyn, Syk cinasa, fosfatidinositol 3 cinasa (PI3K) y Akt, inducción de Bcl-2 proteína antiapoptótica, así como la vía MAPK (73,74). Incluso se ha demostrado que la IL-15 activa los factores de transcripción NF-KB y AP-1 (74). Todas estas vías de señalización están implicadas en la diferenciación, inducción de supervivencia y proliferación de linfocitos T (66,74).

La IL-2 e IL-15 inducen la expresión de FOXP3 de una manera dependiente de STAT5 (48,75,76). Estudios en ratones deficientes en las vías de señalización de los receptores para IL-2 e IL-15 muestran que estos ratones tienen menor número de células Tregs en comparación con los ratones que únicamente carecen de la vía de señalización de IL-2R (51,77). Esto se debe a que, es necesaria la señalización continua de CD122 en los precursores de tTreg que expresan FOXP3 para que se diferencien a tTregs maduras. Además, la señalización de IL-2R es crucial para la inducción de FOXP3 y la maduración funcional de las células tTregs (78).

En cuanto a la posible influencia de la IL-15 en células Tregs en la periferia, evidencia reciente muestra que esta citocina podría potenciar la función supresora de las células Tregs en ciertos ambientes de tejidos especializados (79). En un sistema de cultivo de explantes, se reportó que las células Tregs que se encuentran en piel humana, pueden ser selectivamente expandidas por un tratamiento con IL-15 (80). Adicionalmente, un estudio reciente sugiere que la IL-15 podría contribuir a la homeostasis inmune en el intestino por medio de la regulación del equilibrio entre la diferenciación de células Tregs y células Th17 (81).

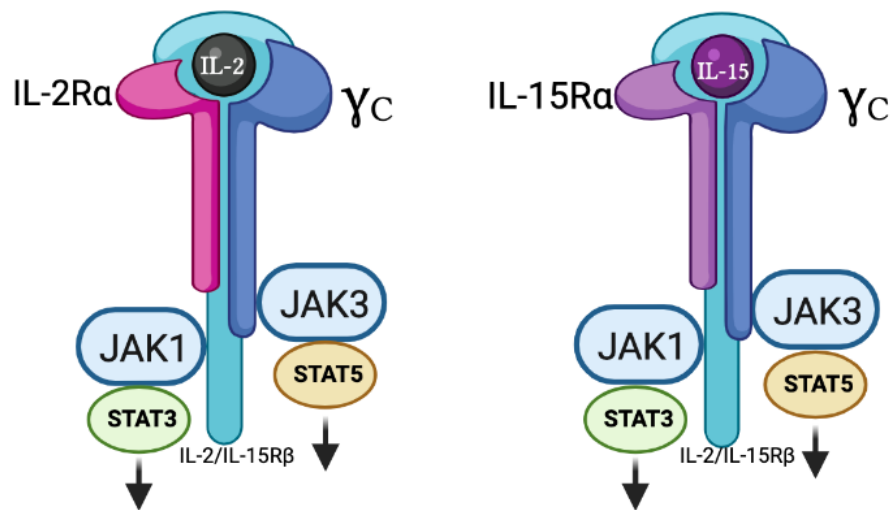


Figura 2. Comparación entre los receptores de IL-2 e IL-15. Componentes del receptor que comparten: IL-2/15Rβ y γ_c . Componentes del receptor propios: IL-15Rα y IL-2Rα (72,82).

2.3.3. Mecanismo de supresión de Tregs

Las células Tregs llevan a cabo diversos mecanismos supresores (Figura 3), incluyendo: dependientes de contacto a través de receptores inhibitorios, por ejemplo, CTLA-4, LAG3, Galectina-1; de citotoxicidad dependientes de perforina o granzima; producción de citocinas antiinflamatorias como IL-10, TGF-β, IL-35.

CTLA-4. Molécula coinhibidora que se expresa constitutivamente en células Treg de ratón y humanas (83). Mediante CTLA-4, las Tregs disminuyen la expresión de CD80/CD86 en las CPAs (84), inhibiendo así indirectamente la activación de células T por CPAs *in vitro* (85) e *in vivo* (86).

LAG-3. Se expresa en células Tregs y se une a moléculas de MHC-II e inhibe la activación de las CDs (87). La deficiencia o el bloqueo de LAG-3 reduce la actividad supresora de las células Tregs *in vitro* (88,89).

CD39. Proteína de membrana que fosfohidroliza ATP o ADP para producir AMP, posteriormente por medio de CD73 puede hidrolizarse a adenosina antiinflamatoria (90). Las células Tregs CD39⁺ suprimen respuestas Th1 y Th17 de manera dependiente de la adenosina (91). Se ha reportado que las células Tregs que expresan CD39 son más estables y tienen una mayor capacidad proliferativa, de supervivencia y de supresión, en comparación con las células Treg CD39⁻ (92,93).

CD73. Es una ectoenzima que cataliza la generación de adenosina a partir de AMP (94). La producción de adenosina por parte de las células Tregs, es importante para la supresión de las respuestas de células T tanto *in vivo* como *in vitro* de una manera dependiente de A_{2A} (95). Se ha propuesto que la expresión superficial de CD73 en células Tregs humanas, se induce tras la activación (96).

IL-10. Esta citocina reduce la expresión de moléculas coestimuladoras presentes en las CDs (97) y de adhesión como CD54 (98). Además, la IL-10 inhibe la proliferación y la producción de citocinas en las células T CD4⁺ (99)(100).

TGF-β. Es una citocina inhibitoria que producen las células Tregs en grandes cantidades de manera soluble y/o unido a la membrana. El bloqueo de TGF-β inhibe la proliferación de células Tconv *in vitro* (101), la diferenciación de células Th1 y Th2, y de CTLs (102–104), y la activación de CDs (105). Además, a través de TGF-β las células Tregs tienen la capacidad de inducir a las células T CD4⁺ no FOXP3 a células Tregs FOXP3⁺ (106).

IL-35. Citocina inhibitoria expresada preferencialmente en la superficie de la células Tregs, que inhibe directamente la proliferación de células Tconv (107,108), incluso puede propagar la tolerancia al generar *de novo* una subpoblación de Tregs que secretan IL-35 (109).

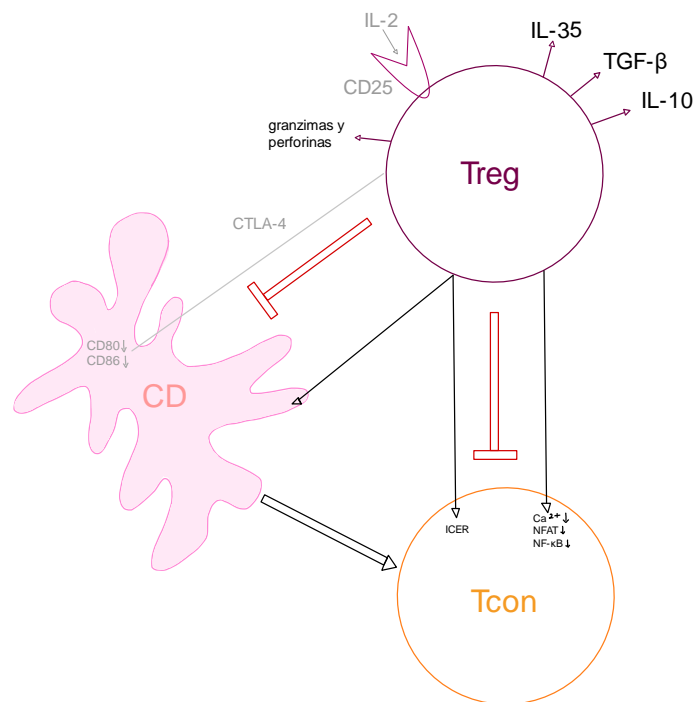


Figura 3. Mecanismos de supresión de la célula Treg. Modificada de (110).

2.3.4. Receptores de quimiocinas presentes en las células Tregs

Una forma de aumentar la especificidad de las células Treg y reducir el riesgo de inmunosupresión inespecífica es hallar formas de optimizar la infiltración de las células Tregs en el injerto. Además, para que las células Treg puedan llevar a cabo sus funciones supresoras de manera adecuada, es necesario que haya un contacto directo célula a célula o una proximidad entre ellas. Por lo anterior, es fundamental que las células Tregs se encuentren próximas a las células inmunes efectoras inflamatorias que se puedan encontrar tanto en el aloinjerto como en los ganglios linfáticos de drenaje local. En este contexto, modelos animales han demostrado que las células Tregs que poseen la capacidad de migrar hacia el injerto son mejores para prevenir el rechazo del órgano trasplantado en comparación con las células Tregs sin esta capacidad (111). La determinación de las quimiocinas que participan en el rechazo del aloinjerto nos conduce al reconocimiento de los receptores de quimiocinas que se encuentran en las células Treg (Figura 4), entre las que se encuentran:

CXCR3 es el receptor de quimiocinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11 que son secretadas por células inmunes en respuesta al interferón y que atraen a las células Th1, CD8 entre otras (112). CXCR3 se ha reportado como elemento crucial para la migración de las células Tregs a los sitios de inflamación, ayudando a controlar respuestas excesivas por parte de células Th1(113). Además, estas quimiocinas en receptores de trasplante de riñón se han asociado con el rechazo y la pérdida temprana del injerto (114).

CCL2 es una quimiocina que se une principalmente a CCR2 y CCR4, reclutando monocitos, células T y CD8. Su presencia en el rechazo agudo en adultos receptores de trasplante de riñón ha sido propuesto como un biomarcador de rechazo (115). En estudios de transferencia de células se ha demostrado que las células Tregs requieren de CCR2 para migrar a los ganglios inflamados y para migrar de los tejidos a los ganglios linfáticos (116). En cuanto al receptor de quimiocinas CCR4, las células Tregs expresan específicamente este receptor y por lo tanto responden a quimiocinas del timo, a quimiocinas reguladas por la activación a través de CCL17 y a las derivadas de macrófagos como CCL22, que son ligandos agonistas de este receptor. Además las CD8 maduras que producen CCL17 y CCL22 atraen preferentemente a las células Tregs, por lo que probablemente la participación de estas quimiocinas está involucrada en la función de las células Tregs (117).

CCR7 es un receptor de linfocitos expresado en células B, T y CD8 activadas y se encuentra implicado en la regulación de la migración de linfocitos a órganos activados (118). Es importante para la migración hacia adentro de las células T desde la corteza a la médula, que se produce durante la

maduración y antes de que las células positivas simples abandonen el timo. Las células Tregs FOXP3⁺ que expresan CCR7, logran alojarse en los ganglios linfáticos, llevando a cabo la expansión por medio de la estimulación del antígeno y suprimiendo respuestas de las células efectoras (119).

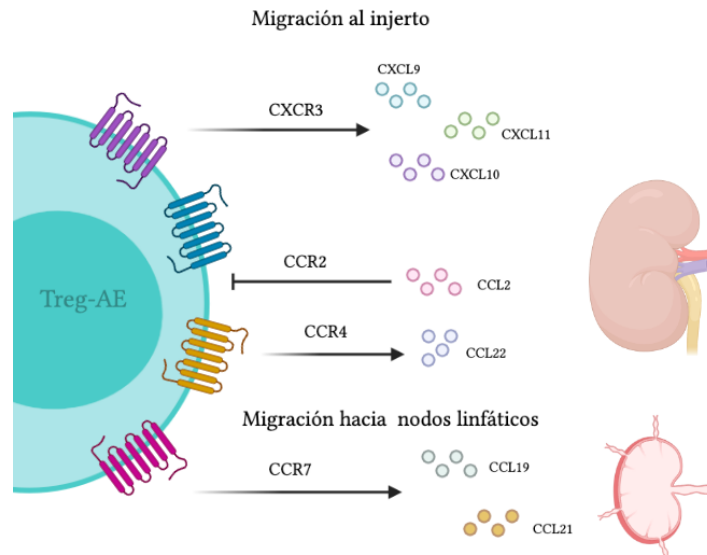


Figura 4. Receptores de quimiocinas en las células Tregs y quimiocinas presentes en el rechazo del injerto. Las células Tregs migran hacia el injerto y ganglios linfáticos con ayuda de las quimiocinas. Tomado y modificado de (111).

2.4. Células Tregs en la tolerancia al trasplante renal

Actualmente, es aceptado que las células Tregs juegan un papel clave en la tolerancia a trasplantes. Las células Tregs suprimen la función de las células Th, linfocitos B y células del SI innato (CDs, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y NKs) y en diversos modelos animales se ha demostrado que inducen la tolerancia hacia aloinjertos de piel, islotes pancreáticos, corazón y riñón (120). Además, estudios en ratón con TR allogénico, la eliminación específica y sistémica de las células Tregs FOXP3⁺ resulta en un rechazo agudo caracterizado por una exacerbada infiltración de células T, neutrófilos y monocitos en el injerto, acompañado de un incremento significativo de citocinas inflamatorias (IL-6, IFN- γ , TNF- α) en suero (121,122).

En humanos, la presencia de células Tregs intrainjerto es predictor de un resultado favorable del trasplante renal a largo plazo (123). Además, pacientes con trasplante de riñón que desarrollaron tolerancia clínica operacional (individuos que ya no requieren administración de FI) exhiben un incremento significativo de células T FOXP3⁺ en sangre o en biopsias renales, en comparación con receptores renales estables no tolerantes (aún mantenidos con FI) o con rechazo activo (124,125).

Debido a lo anterior, ha habido un gran interés en desarrollar inmunoterapias usando células Tregs para la inducción de tolerancia al trasplante.

Uno de los principales retos de las terapias basadas en células Tregs es su bajo número en sangre (<10% del total de células T CD4⁺), lo cual se ha postulado que sería insuficiente para inducir tolerancia al aloinjerto. Se han establecido dos enfoques clínicos para incrementar del número de células Tregs en los receptores de trasplantes:

I. Expansión de células Tregs in vivo.

Para incrementar el número y/o porcentajes de Tregs, se ha propuesto la administración de agentes exógenos. Particularmente, el uso de inhibidores de mTOR como la rapamicina han mostrado inhibir de manera preferencial la proliferación de células Tconv y al mismo tiempo favorecer el incremento de células Tregs (126). Sin embargo, los efectos secundarios causados por inhibidores de mTOR (Tabla 3) han obstaculizado su aplicación clínica. Otro enfoque ha sido la administración IL-2 a dosis bajas para expandir *in vivo* células Tregs, las cuales responden a bajas dosis de IL-2 de forma óptima debido a que tienen mayor expresión de la cadena α del receptor de IL-2 en comparación con las células Tconv. Este tipo de terapia ha mostrado ser prometedora para el tratamiento de la enfermedad crónica de injerto contra huésped y vasculitis. Aún faltan realizar estudios clínicos para evaluar la eficacia de la administración de IL-2 en bajas concentraciones en el contexto de trasplante de órganos sólidos (120). Adicionalmente, el tratamiento con IL-2 no puede sustituirse por la transferencia adoptiva de células Tregs para promover la aceptación de injerto de médula ósea (127).

II. Transferencia adoptiva de Células Tregs como una terapia celular.

La terapia celular ha sido utilizada como un medio para aumentar las células Treg en los pacientes. De este enfoque existen dos principales procesos de manufactura para obtener las células Tregs. En el primero, se aíslan las células Tregs de sangre del receptor y se expanden con agentes mitógenos como anticuerpos anti-CD3/-CD28 más IL-2 para obtener Tregs policlonales (no específicos hacia aloantígenos del donador), para posteriormente volverlas a infundir en el receptor del alotrasplante (128). En el segundo tipo de proceso, las células Tregs del receptor se estimulan con células presentadoras de antígenos (naturales o artificiales) del donador o del receptor (cargadas con aloantígenos) para obtener Tregs con aloespecificidad directa o indirecta (ver sección 2.1.1). Aunque las células Tregs aloantígenos-específicas (Tregs-AE) son más difíciles de manufacturar debido a su baja frecuencia en sangre (<10% del total de Tregs), sin embargo, son más eficaces para prevenir el rechazo e inducir tolerancia al trasplante en modelos animales en comparación con las células Tregs policlonales (129).

2.3. Antecedentes directos

2.3.1 Retos actuales de la inmunoterapia con Tregs en humanos

A pesar de los esfuerzos por establecer protocolos para obtener productos que cumplan con los criterios de calidad, los investigadores encuentran desafiantes ciertos problemas como la obtención de un número adecuado de células Tregs-AE, la calidad y pureza del producto celular, el como asegurar la desmetilación de la región del TSDR del gen FOXP3 (Tabla 5) y la esterilidad del producto antes de administrar a los pacientes.

Tabla 5. Metodologías de expansión de células Tregs-AE

Población inicial purificada	Estimulación	Factores de crecimiento	Lapso de expansión	Expansión (incremento relativo)	% de desmetilación del TSDR	Referencia
Células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ aisladas por perlas magnéticas	CMNs derivadas del donador	IL-2 + IL-15	20 días	780	Desconocido	(130)
Células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ aisladas por FACS	Células B del donador activadas con CD40L	IL-2	16 días	50-300	94%	(131)
Células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ aisladas con perlas magnéticas	CDs alogénicas maduras	IL-2 + IL-15 + Rapamicina	21 días	8.3	80%	(132)
Células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ aisladas por FACS	CDs CD11c ⁺ maduras de sangre o piel	IL-2	28 a 42 días	80-120	Desconocido	(133)
Células Tregs CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ aisladas por perlas magnéticas	CDs derivadas de monocitos alogénicos	IL-2 + IL-15 + Rapamicina	12 días	8	Desconocido	(134)
Células nTreg CD4 ⁺ CD25 ^{hi} CD127 ⁻	CDs derivadas de monocitos maduras	IL-15 e IL-2 + IL-15	12 días	128	>90% en hombres y >45% en mujeres	(135)
Células Tregs CD4 ⁺ CD25 ⁺ marcadas con CFSE	CMNs derivadas del donador	IL-2 + IL-15	9-11 días	10.2	Desconocido	(136)

Tomada y modificada de (137).

Un trabajo recientemente publicado por parte de nuestro grupo de investigación, mostró una metodología donde las células Tregs (marcadas con CTV) fueron cocultivadas con mo-CDs alogénicos en presencia de IL-2 y ácido retinoico. Posteriormente, se obtuvieron las células Tregs-AE CTV⁻ por medio de FACS y se realizaron cuatro ciclos de re-expansión con anti-CD3/-CD28, en

presencia de TGF- β , IL-2 y rapamicina, paso fundamental para obtener un mayor número de células Tregs-AE. Pasadas las semanas de expansión policlonal, las células Tregs-AE se expandieron hasta 2300 veces basados en números iniciales con una pureza mayor al 95% de células CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺. Además, las células obtenidas mostraron un fenotipo altamente supresor al expresar CTLA-4, LAG-3 y CD39. No obstante, la expansión a largo plazo inesperadamente provocó un aumento de la metilación del TSDR de *Foxp3*, a pesar de que seguían manteniendo su fenotipo inmunorregulador (expresión de FOXP3, supresión *in vitro*) después de una estimulación *in vitro* en un ambiente inflamatorio y no secretaron citocinas inflamatorias como IL-6, IFN- γ y TNF- α (138). Sin embargo, modelos en ratones han demostrado que la desmetilación del TSDR de *Foxp3* es importante para mantener su identidad celular durante respuestas inflamatorias (60). Debido a lo anterior, aún es necesario optimizar el protocolo de expansión de Tregs aloespecíficas mediante dos enfoques no mutuamente excluyentes: primero, la adición de factores de crecimiento que incremente la proliferación de Tregs para disminuir los tiempos de expansión; y segundo, aislar una subpoblación de Tregs con una mayor estabilidad celular después de una estimulación *in vitro*.

Función de la IL-15 en la expansión *ex vivo* de células Tregs-AE

Debido a la importancia de la IL-15 en la generación de células Tregs tímicas y su homeostasis, esta citocina se ha utilizado en metodologías de expansión de células Tregs-AE. Experimentos llevados a cabo por el grupo de Veerapathran y colaboradores reportaron que la estimulación de células Tregs con CDs-Alo en presencia IL-2, IL-15 y rapamicina inducen un incremento significativo de la proliferación de Tregs aloespecíficas en comparación con solo estimular con IL-2 o IL-15 (134). En otro estudio realizado por Litjens y colaboradores donde utilizan a la IL-15 (10 ng/mL) se demostró que facilita la expansión de células nTregs por células mo-CDs maduras de manera óptima, sin necesidad de la IL-2 (135) (Tabla 5).

Selección *ex vivo* de células Tregs humanas por medio de la expresión de CD27 y CD70.

Como se reportó en nuestro grupo de investigación y como por parte de otros experimentos, las células Tregs expandidas *in vitro* por largos periodos de tiempo, incrementan la metilación en el TSDR de FOXP3, por lo que es imprescindible obtener células Tregs con la capacidad de mantener esta región desmetilada.

CD27 es un receptor coestimulador, que se expresa constitutivamente en células Tregs CD4⁺FOXP3⁺ (139), y se puede incrementar tras la activación (140). Su unión con CD70 presente en las APCs

promueve la activación de las vías de señalización de PI3K-AKT-mTOR, MAP cinasas y NF-κB, induciendo la activación celular, proliferación, supervivencia, secreción de citocinas y diferenciación de las células T (141) . Además, la alta expresión de CD27 en células Tregs podría disminuir el acceso de las Tconv hacia esta molécula coestimuladora en las CDs (142). Dos trabajos independientes demostraron de manera independiente que las células Tregs que tienen una alta expresión de CD27 (Tregs CD27⁺) tienen una mayor capacidad inmunoreguladora, incluyendo mayor expresión de FOXP3 y Helios, mayor capacidad de supresión *in vitro*, y de manera importante un TSDR desmetilado tras varios ciclos de expansión (136,143). Debido a estos reportes, una opción para favorecer la obtención de células Tregs-AE estables, es realizar una purificación basada en la expresión CD27.

4. Justificación

En los primeros ensayos clínicos en humanos, la inmunoterapia celular basada en la transferencia de linfocitos Treg policlonales ha demostrado ser segura y potencialmente eficaz en receptores renales. No obstante, en modelos animales se ha demostrado que el uso de Tregs aloantígeno-específicas (AE) sería un mejor enfoque para la inducción de tolerancia a largo plazo, comparado con las Tregs policlonales. En humanos, la manufactura de células Tregs-AE ha sido un reto debido a su baja frecuencia (<10% del total de Tregs). En este contexto, un trabajo previo de nuestro laboratorio demostró que la expansión policlonal a largo plazo (cuatro semanas) de células Tregs-AE CD25^{hi} incrementan la expresión de marcadores inmunorreguladores (FOXP3, CD25, CTLA-4) y suprimen la proliferación de células Tconv de manera aloantígeno-específica. Sin embargo, la expansión generó una reducción de la desmetilación del TSDR-*Foxp3* en las Tregs-AE. Por consiguiente, aún es necesario estudiar otros enfoques experimentales que favorezcan el mantenimiento de la identidad celular de las Tregs-AE (expresión de FOXP3, Helios, desmetilación del TSDR-*Foxp3*) y al mismo tiempo obtener suficientes Tregs con fines terapéuticos.

La IL-15 es una citocina que tiene la capacidad de inducir la activación y proliferación de las células Tregs *in vivo*, además de inducir la expresión de FOXP3. Estudios *in vitro* han demostrado que la adición de IL-2 en presencia de IL-15 incrementa el número de células Tregs-AE, sin afectar su fenotipo inmunorregulador. Por otra parte, se ha descrito que después de una estimulación *in vitro* del TCR/CD28 y en presencia de IL-2 de las células Tregs, es posible distinguir la subpoblación de Tregs CD27^{hi}, las cuales presentan una mayor expresión de FOXP3, superior capacidad supresora, incremento de la desmetilación del TSDR-*Foxp3* y mantiene sus características inmunorreguladoras aún después de una estimulación *in vitro* a largo plazo, comparado con Tregs CD27^{lo}. Tomando en cuenta lo anterior, es necesario estudiar el efecto de la IL-15 sobre la proliferación y el fenotipo de las células Tregs CD27^{hi} aloantígeno-específicas empleando el protocolo de expansión *in vitro* previamente establecido en nuestro laboratorio.

5. Hipótesis

Las células Tregs CD27^{hi} aloantígeno-específicas expandidas *ex vivo* en presencia de IL-15 incrementarán su proliferación y mantendrán su fenotipo inmunosupresor, con respecto a la ausencia de IL-15.

6. Objetivo general

Investigar el efecto de la IL-15 en la proliferación y en el mantenimiento del fenotipo supresor de células Tregs CD27^{hi} aloantígeno específicas expandidas *in vitro*.

7. Objetivos particulares

1. Evaluar la expresión de HLA-DR, CD86 y CD11c en las células dendríticas derivadas de monocitos de individuos sanos, generadas *in vitro*.
2. Aislar y expandir *ex vivo* las células Tregs CD27^{hi} aloespecíficas de individuos sanos en presencia o ausencia de IL-15.
3. Analizar la expresión de marcadores relacionados con la función inmunorreguladora (FOXP3, CD25, CTLA-4, LAG-3, CD39, Helios, CCR2, CCR4, CCR7 y CXCR3) en células Tregs-AE CD27^{hi} expandidas *ex vivo*.
4. Evaluar la función supresora de células Tregs-AE CD27^{hi} expandidas y su aloespecificidad.
5. Evaluar la pureza de las Tregs-AE CD27^{hi} expandidas.

8. Metodología

8.1. Población de estudio

Se utilizaron muestras de individuos sanos que cumplieron los criterios de inclusión (ver siguiente párrafo) reclutados en el banco de sangre del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMN-SZ). Para realizar el estudio, se contó con la previa aprobación del protocolo por los comités de ética del INCMN-SZ, y del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. El estudio se realizó en conformidad con la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, y con las Buenas Prácticas Clínicas.

Los criterios de inclusión son: Individuos sanos sin antecedentes de enfermedad neoplásica, inflamatoria crónica o proceso infeccioso activo. Sexo masculino, con edad entre 18 y 50 años.

8.2 Materiales y reactivos

Anti-CD4 Alexa Fluor 488, Anti-CD25 PE, Anti-CD39 BV711, Anti-LAG-3 PECy7, Anti-CTLA-4 Brilliant Violet 421, Anti-FOXP3 Alexa Fluor 647, Anti-Helios PE-Dazzle, Anti-CCR7 PerCP-Cy5.5, Anti-CXCR3 Brilliant Violet 711, Anti-CCR2 Brilliant Violet 605, Anti-CCR4 Brilliant Violet 421, anti-CD45RA APC-Fire 750, Anti-HLA-DR APC-Cy7 y Zombie Aqua Fixable Viability Kit se obtuvieron de Biolegend (San Diego, E.U.A). Anti-CD8 PE-Cy7, Anti-CD4 APC, Anti-CD19 FITC, Anti-CD3 PE, Anti-CD11c APC, AntiCD86 PE y Anti-CD27 PE-Cy7 se obtuvieron de Tonbo Biosciences (San Diego, E.U.A). Carboxyl Fluorescein Succinimidyl Ester (CFSE), CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit (CTV), Dynabeads Human T-activator CD3/CD28 (perlas anti-CD3/anti-CD28), DynaMag-5™ Magnet (Dynamag), Optimazer™ T Cell Expansion Supplement (medio de expansión), L-Glutamina 100X, Piruvato de sodio 100X, Aminoácidos No-Esenciales 100X, antibiótico-antimicótico 100x Azul de tripano (0.4%), medio de cultivo RPMI y suero fetal bovino (SFB) se obtuvieron de Thermo Scientific (Waltham, E.U.A). Suero Humano AB de Mayimex. Rapamicina, ATRA (ácido holo-transretinóico), Ficoll-Paque™ y Dimetilsulfóxido (DMSO) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (San Luis, E.U.A). Citocinas humanas recombinantes IL-2, IL-15, IL-4, GM-CSF, y TGF- β de PeproTech (Cranbury, E.U.A). Todos los medios de cultivo empleados fueron suplementados con L-Glutamina, Piruvato de sodio, Aminoácidos No-Esenciales y antibiótico-antimicótico.

8.3. Separación y criopreservación de células mononucleares de sangre periférica

Se colectaron concentrados leucocitarios de individuos reclutados en el banco de sangre del INCMNSZ. Los concentrados leucocitarios se diluyeron en solución amortiguadora PBS 1X en una relación 1:2, la muestra diluida se colocó en un tubo con Ficoll-Paque en una proporción de 1:3 (Ficoll:muestra). El tubo se centrifugó 30 minutos a 2000 rpm (sin aceleración y sin freno) a 20°C y se recolectaron las células mononucleares (CMNs) de la interfase, las cuales se lavaron tres veces con PBS 1X y después del último lavado las células se mantuvieron en medio de cultivo RPMI suplementado con 10% SFB. Se realizó el conteo celular y se determinó la viabilidad por exclusión de azul de tripano. Las CMNs fueron criopreservadas en una solución de 90% SFB y 10% DMSO por 24 horas a -70°C y al finalizar dicho periodo los crioviales se transfirieron a nitrógeno líquido para su almacenamiento a largo plazo.

Para los ensayos indicados más adelante, las células criopreservadas se descongelaron en un baño de agua a 37°C e inmediatamente se transfirió la suspensión celular a un tubo que contenía un exceso de

medio RPMI suplementado con 10% SFB previamente atemperado a 37°C; después, las células se lavaron tres veces con el mismo RPMI 10% SFB. Finalmente, las células se contaron y se les determinó su viabilidad por exclusión de azul de tripano.

8.4. Diferenciación y caracterización de células dendríticas derivadas de monocitos (CDs-mo)

Se purificaron monocitos CD14⁺ a partir de CMNs mediante el uso del kit Human CD14 Microbeads (Miltenyi Biotec) siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, las CMNs se lavaron con solución amortiguadora MACS, se añadieron 20 µL de CD14 MicroBeads por cada 20x10⁶ de CMNs y se incubaron 20 minutos a 4°C. Posteriormente, las CMNs se lavaron con solución MACS y los monocitos CD14⁺ fueron obtenidos por selección positiva con el sistema de separación magnética usando columna MACS (Miltenyi Biotec). Los monocitos CD14⁺ aislados se lavaron con medio RPMI 10% SH-AB 1500 rpm por 5 minutos a 4°C, se realizó el conteo celular y se determinó la viabilidad por exclusión de azul del tripano. Los monocitos CD14⁺ aislados se cultivaron durante ocho días a 37°C y 5% CO₂ en medio RPMI 10% SH-AB suplementado con citocinas IL-4 (50 ng/mL) y GM-CSF (50 ng/mL); en el día 3 y 5 se realizó cambio de medio de cultivo con citocinas IL-4 (25 ng/mL) y GM-CSF (25 ng/mL); además, en el día 5 se maduraron las células con IL-6 (10 ng/mL), IL-1β (10 ng/mL) y TNF-α (10 ng/mL). Al finalizar el cultivo (día 8), se recuperaron las células dendríticas en un tubo con medio RPMI 10% SFB, se irradiaron a 3000 rads y se lavaron dos veces con RPMI 10% SFB.

Para caracterizar las CDs-mo, una alícuota de éstas fue marcada superficialmente con anticuerpos acoplados a fluorocromos anti-CD86, anti-CD11c y anti-HLA-DR, y el marcador de viabilidad Zombie Aqua™ durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad; después, las células se lavaron con solución FACS y se fijaron con paraformaldehído al 2%; las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo Attune Nxt (Thermo Scientific) y los datos se analizaron con el programa Flowjo (ver estrategia de análisis en la figura suplementaria A). Además, se realizó un co-cultivo *in vitro* de linfocitos T de individuos sanos (marcados con CFSE) con CDs-mo autólogas, con CDs Alogénicas o perlas acopladas con anti-CD3/CD28; al día 5 de cultivo, las células fueron marcadas con anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 y Zombie Aqua™ (20 min, temperatura ambiente en oscuridad), se lavaron con solución de FACS, se fijaron con paraformaldehído al 2% y las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo Attune NXT para determinar la proliferación de células T CD8⁺ y CD4⁺ por dilución del CFSE analizando en el programa Flowjo (ver estrategia de análisis en la figura suplementaria B).

8.5. Purificación de células Tregs

Se descongelaron las CMNs y se prosiguió a teñirlas con anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos anti-CD4, anti-CD25, anti-CD127, anti-CD45RA y el marcador de viabilidad Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad y después. las células se lavaron con PBS 1X. Se purificaron las células Tregs CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻ y células T-naïve CD4⁺CD25⁻CD127^{-/+}CD45RA⁺ (ver figura suplementaria C) en el citómetro de flujo MoFlo XDP (Beckman Coulter) colectándolas en tubos con medio de cultivo RPMI con 20% SFB. Posterior a la purificación, los tubos se centrifugaron a 1500 rpm por 10 minutos 4°C, se decantó todo el sobrenadante y las células se suspendieron en medio de expansión suplementado con 10% de SH-AB. Las células se contaron y determinó la viabilidad celular para continuar con los ensayos.

8.6. Aislamiento y expansión *ex vivo* de células Tregs aloespecíficas (Tregs-AE)

Las células T CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻ purificadas se marcaron con CTV siguiendo las instrucciones del fabricante, se estimularon con CDs-mo alogénicas irradiadas en medio de expansión suplementado con 10% SH-AB, IL-2 (250-1000 UI/mL) y ATRA (1 μM) en presencia o ausencia de IL-15 (10 ng/mL). En el día 7 de cultivo, se purificaron las células Tregs proliferantes CD4⁺CD25^{hi}CTV^{lo}CD27^{hi} (aloespecíficas, AE) y las no-proliferantes CD4⁺CD25⁺CTV⁺CD27^{hi} (No-aloespecíficas, NAE) (ver figura suplementaria D) usando el citómetro de flujo MoFlo XDP (Beckman Coulter), las células se colectaron en medio de cultivo RPMI 20% SF; ver Figura suplementaria D. En un cultivo en paralelo, las células T CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻ (marcadas con CTV) se estimularon con perlas anti-CD3/CD28, IL-2 (250 UI/mL) y ATRA (1 μM), y en el día 7 se purificaron las células proliferantes CD4⁺CD25^{hi}CTV^{lo}CD27^{hi} (policlonales, Poli). Todas las células purificadas (AE, NAE y policlonales) se centrifugaron y se cultivaron en medio de expansión suplementado con 10% SH-AB e IL-2 (50 UI/mL) durante tres días. Después, las células Tregs se expandieron policlonalmente en medio de expansión 10% SH-AB en tres ciclos de estimulación y reposo, cada uno de 7 días que se basaron en: cuatro días de estimulación con perlas magnéticas acopladas con anti-CD3/anti-CD28 en una proporción 1:2 (perla:Tregs), rapamicina (100 ng/mL), TGF-β (2.5 ng/mL) e IL-2 (250-1000 U/mL) en presencia o ausencia de IL-15 (10 ng/mL); posteriormente, se retiran las perlas magnéticas con el DynaMag y las células se colocan tres días de reposo en medio de expansión con IL-2 (50 U/mL). Después de tres semanas de expansión policlonal se realizaron ensayos de supresión *in vitro* e inmunotipificación celular mediante citometría de flujo.

En un cultivo en paralelo, las células T naïve CD4⁺CD25⁻CD127^{+/+}CD45RA⁺ se expandieron policlonalmente en medio de expansión 10% SH-AB durante cuatro ciclos de estimulación/reposo: cuatro días de estimulación con perlas anti-CD3/anti-CD28 en una proporción 1:2 (perla:Tnaïve), IL-2 (250 U/mL) e IL-15 (10 ng/mL); seguidos de tres días de reposo en medio de expansión con IL-2 (50 U/mL). Al final, se realizaron ensayos de inmunotipificación mediante citometría de flujo.

8.7. Ensayo de supresión aloantígeno-específico *in vitro*

Las células Tregs expandidas (marcadas con CTV) se co-cultivaron con células T convencionales (Tconv) autólogas (marcadas con CFSE) aisladas con Pan T Cell Isolation Kit (siguiendo las instrucciones del fabricante) en distintas proporciones de Tregs:Tconv (1:0, 1:1, 1:3, 1:9, 1:27 y 0:1) y se estimularon con CDs-o alogénicas perlas anti-CD3/anti-CD28 en medio de expansión 10% SH-AB. Al día 4, se hizo una tinción superficial con anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD3 durante 20 minutos a 4°C en oscuridad, después se lavaron con solución FACS y se fijaron con paraformaldehído al 2%. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo Attune NxT para determinar la proliferación de células Tconv CD8⁺ y CD4⁺ por dilución del CFSE, y las Tregs marcadas con CTV fueron excluidas del análisis. Ver estrategia de análisis en la figura suplementaria E. Los datos se analizaron con el programa Flowjo.

8.8. Inmunotipificación de células Tregs por citometría de flujo

Muestras de células T expandidas fueron marcadas superficialmente con anti-CD4, anti-CD25, anti-CCR7, anti-CXCR3, anti-CCR2, anti-CCR4, anti-LAG3, anti-CD39 y Aqua Zombie durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad y, posterior a esto, se lavaron con solución FACS. Para realizar la tinción intracelular, se utilizó FOXP3/Transcription Factor Staining Buffer Kit siguiendo las indicaciones del fabricante (TONBO biosciences). Brevemente, después del lavado con la solución FACS, se añadió la solución Fijación/Permeabilización e incubó 1h a temperatura ambiente en la oscuridad; después las células se centrifugaron y se lavaron con la solución de permeabilización 1X. Se realizó la tinción intracelular con anti-FOXP3, anti-Helios y anti-CTLA-4 durante 30 min a 4°C en oscuridad; las células se lavaron con solución amortiguadora de permeabilización. Las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo Attune NxT y los resultados (frecuencias e intensidades medianas de fluorescencia) se analizaron con el programa Flowjo vX.0.7. Ver estrategia de análisis, figura suplementaria F.

8.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa de cómputo GraphPad Prism 9 (San Diego, E.U.A). Para determinar la distribución de los datos, se utilizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Las pruebas T-Student pareada o no pareada fueron usadas para comparar los datos de dos grupos con distribución normal. La prueba de la Suma de rangos de Wilcoxon o la prueba U de Mann-Whitney se utilizaron para comparar datos de dos grupos pareados o no pareados, respectivamente, con distribución no normal. Las diferencias entre más de dos grupos se calcularon utilizando la prueba de ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis para datos con distribución normal o no normal, respectivamente. Los gráficos se expresan como Media \pm Error Estándar de la Media (EEM). Para las pruebas estadísticas se utilizó un nivel de significancia del 0.05.

8.9 Diagrama de flujo del diseño experimental

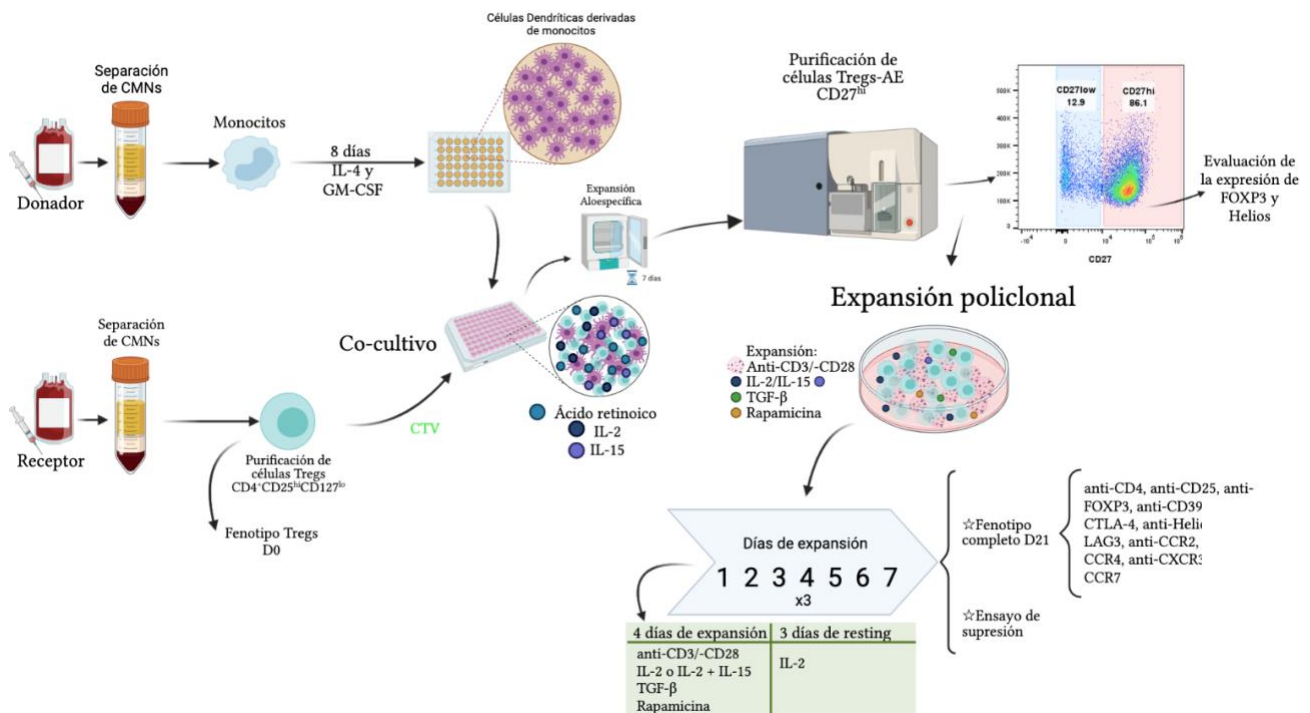


Figura 5. Diagrama del protocolo experimental de la expansión *ex vivo* de células Tregs.

9. Resultados

9.1. Células dendríticas derivadas de monocitos inducen la proliferación de células T aloespecíficas

Las células dendríticas son las células presentadoras de antígeno por excelencia, debido a su mayor capacidad para inducir la activación y proliferación de células T *in vitro* e *in vivo* (10). Estudios previos han demostrado que CDs expanden efectivamente a células Tregs específicas para aloantígenos, con el propósito de generar un gran número de Tregs-AE a partir de un volumen aceptable de sangre periférica, como se ha visto en otros experimentos (132,134,138). Por ende, el presente trabajo utiliza a las CDs derivadas de monocitos (CDs-mo) alogénicas.

Previo a la expansión de células Tregs-AE, se caracterizaron las células dendríticas derivadas de monocitos generadas *in vitro* maduras con citocinas inflamatorias (IL-6, IL-1 β y TNF- α) con el fin de evaluar su capacidad de célula presentadora de aloantígenos. El análisis por citometría de flujo de marcadores típicos de células dendríticas mostró que las CDs-mo maduras *in vitro* presentan una alta proporción de CD86⁺ (91.9 \pm 9.9 %, Fig. 6A), CD11c⁺ (89.9 \pm 15.7 %, Fig. 6B) y HLA-DR⁺ (99 \pm 0.5 %, Fig. 6C). Para evaluar si la alta expresión de moléculas de MHC-II (HLA-DR) y coestimuladoras de linfocitos T (CD86) en las CDs-mo se correlacionaba con su capacidad para inducir la activación y proliferación de linfocitos T alogénicos, se realizaron co-cultivos *in vitro* de CDs-mo y células T (marcadas con CFSE). Como control positivo de proliferación, las células T fueron estimuladas con perlas acopladas a anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28. Como se muestra en la Figura 6, la estimulación policlonal con anti-CD3/anti-CD28 induce una óptima proliferación de células T CD3⁺CD4⁺ (92.3 \pm 3.7 %, Fig. 6D) y T CD3⁺CD8⁺ (95.3 \pm 3.1 %, Fig. 6E). Cuando los linfocitos T fueron estimuladas con CDs-mo autólogas, hubo una mínima proliferación (<15%) tanto de las células T CD3⁺CD4⁺ (11.43 \pm 7.8 %, Fig. 6D) y T CD3⁺CD8⁺ (11.6 \pm 7.9 %, Fig. 6E). De manera importante, las células dendríticas derivadas de monocitos alogénicas indujeron una mayor proliferación en las células T CD3⁺ comparado con CDs autólogas, siendo estadísticamente significativa tanto en células T CD4⁺ (35.9 \pm 18.5 vs 11.4 \pm 7.8 %, p=0.0031; Fig. 6E) como en CD8⁺ (35.2 \pm 25.8 vs 11.6 \pm 7.7 %, p=0.0348; Fig. 6E).

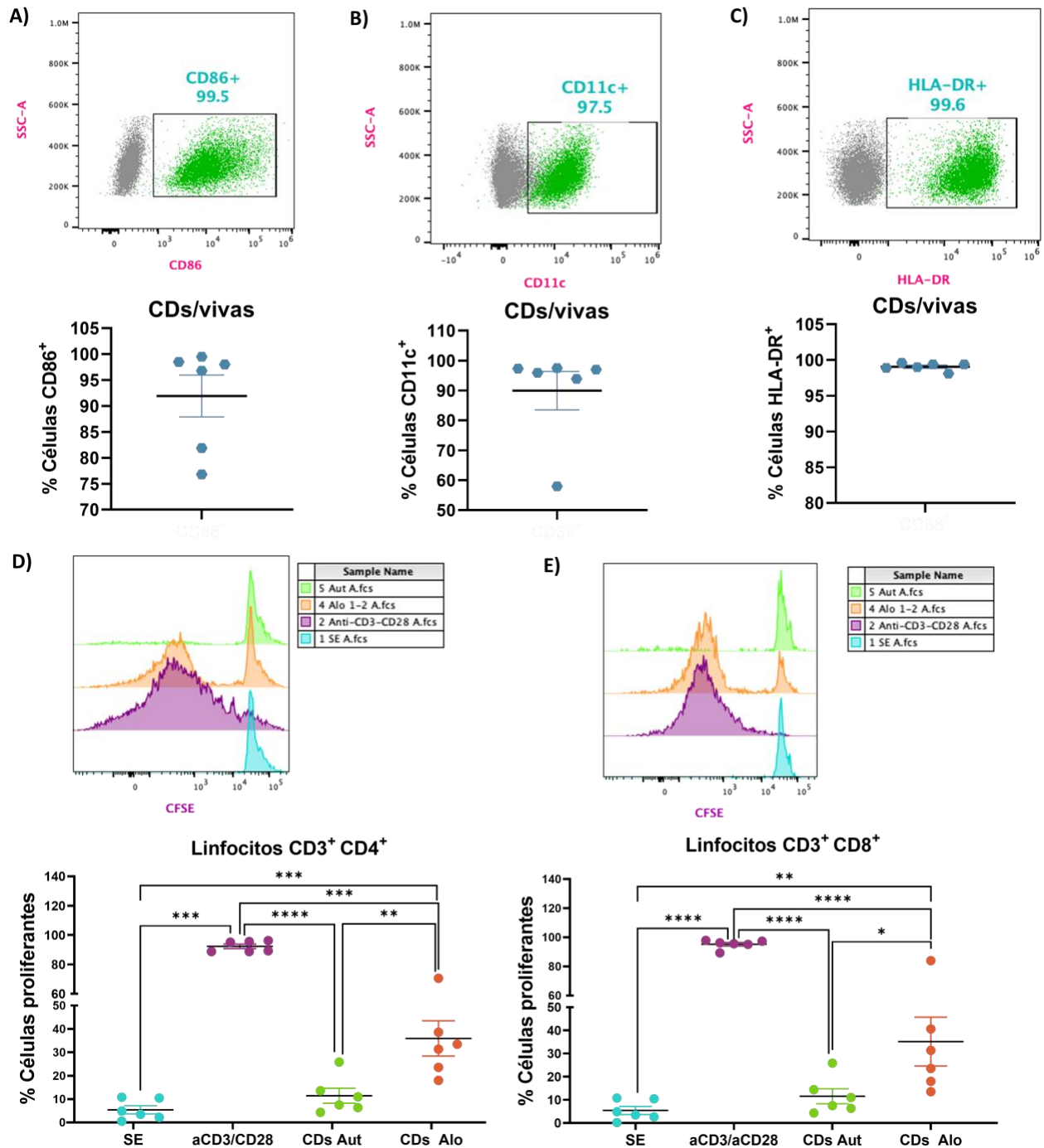


Figura 6. Caracterización de células dendríticas derivadas de monocitos generadas *in vitro*. Para la diferenciación de CDs, los monocitos aislados de CMNs de individuos sanos fueron cultivados durante 8 días con IL-4 y GM-CSF. A-C) El análisis por citometría de flujo muestra que las CDs-mo tienen un alto porcentaje de células CD86⁺ (A), CD11c⁺ (B) y HLA-DR⁺ (C). D-E) Para evaluar la proliferación, los linfocitos T (marcados con CFSE) fueron co-cultivados 5 días con CDs autólogas (Aut) o alogénicas (Alo); las condiciones Sin estímulo (SE) y CDs-Aut se utilizaron como controles negativos y, anti-CD3/anti-CD28 como control positivo. Las CDs-mo alogénicas indujeron una mayor proliferación de células T CD3⁺CD4⁺ (D) y CD3⁺CD8⁺ (E) comparado con CDs-Aut. En los incisos A-E se muestran experimentos representativos. En A-C se utilizó FMO como control de tinción representado en color gris. Ver estrategias de análisis en las Figuras Suplementarias A y B. Los resultados se presentan como la Media ± EEM. En los incisos D y E, el análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de una vía, y las diferencias significativas se indican como *p<0.05, **p<0.001, ***p<0.0001, ****p<0.00001.

9.2. IL-2 e IL-15 promueven la proliferación de células Tregs-aloespecíficas CD27^{hi}.

Con el objetivo de obtener células Tregs humanas con una alta pureza, el aislamiento de linfocitos T CD4⁺CD25⁺CD127^{lo} permitiría discriminar células Tregs de Tconv, ya que existe una correlación inversa entre la expresión del CD127 y FOXP3 (144). Los resultados obtenidos muestran que el aislamiento por citometría de flujo permite obtener células T CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo} de sangre con una pureza mayor al 95% (97.8 ± 1.3 %). FOXP3 (48) y Helios (145) son dos factores de transcripción expresados preferencialmente en células Tregs y son importantes para regular sus funciones inmunorreguladoras. De manera importante, los datos muestran que las células T CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo} purificadas por FACS poseen una alta frecuencia de células FOXP3⁺ (93.6 ± 4.2 %, Fig. 7B) y Helios (87.7 ± 1.9 %, Fig. 7C), lo que confirma el aislamiento de linfocitos Tregs.

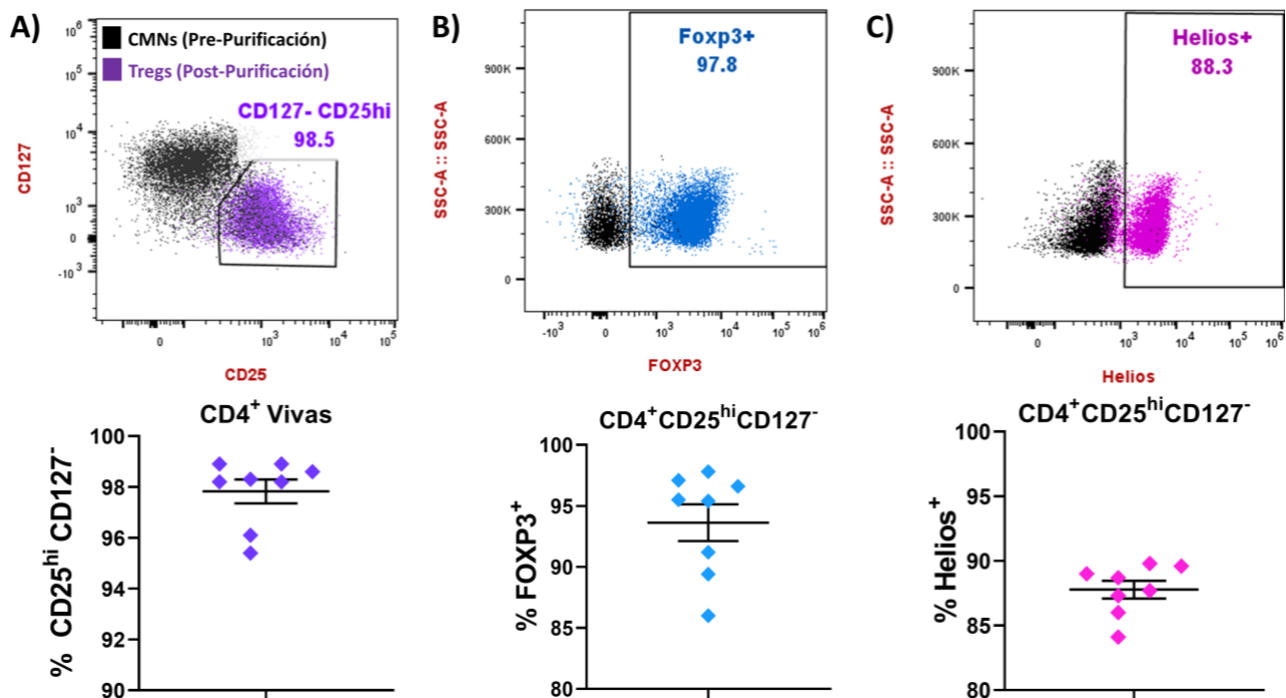


Figura 7. Caracterización de células T CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻ purificadas mediante citometría de flujo. Para la purificación de Tregs, se marcaron CMNs de individuos sanos con anticuerpos monoclonales y se aislaron las células de CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻ por FACS; después, se evaluó la pureza (A) y la expresión de FOXP3 y Helios en las células aisladas por citometría de flujo. A) Porcentaje de células T CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻ después de la purificación por FACS. B-C) Las células T CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻ purificadas tienen una alta expresión de los factores de transcripción FOXP3 (B) y Helios (C) característicos de Tregs. Como control de tinción se utilizó FMO, representado en color negro en los incisos B y C. Los resultados se muestran como la Media \pm EEM.

Una vez que se purificaron los linfocitos Tregs, se evaluó el efecto de la IL-2 + IL-15 sobre la proliferación y viabilidad de las células Tregs aloantígeno-específicas. Para lo anterior, se modificó un protocolo establecido en el laboratorio recientemente publicado (138), donde células Tregs CD25^{hi}CD127^{lo} (marcadas con CTV) fueron estimuladas con CDs-mo alogénicas maduras, ácido retinoico (AR) e IL-2 (250, 500 y 1000 UI/mL) en presencia o ausencia de IL-15 (10 ng/mL), esta última concentración fue basada en estudios previos (83,132,135,146). Como control positivo de proliferación, las células Tregs CD25^{hi}CD127^{lo} se estimularon con anti-CD3/CD28 (Tregs-Poli). Al día 7 de co-cultivo, las CDs-mo alogénicas indujeron la proliferación (evaluada por la dilución del marcaje de CTV) de linfocitos Tregs CD25^{hi} (denominadas de aquí en adelante como Tregs-AE), pero no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células Tregs en proliferación (CD4⁺CD25^{hi}CTV^{lo}) al comparar los cultivos estimulados con IL-2 en presencia o ausencia de IL-15 (Fig. 8 A y B).

Para un estudio más minucioso del efecto de la IL-15 y la IL-2 sobre la división celular, se determinó el índice de proliferación el cual es el número promedio de divisiones que han sufrido las células Tregs-AE. Como se muestra en la figura 8C, no se encontraron diferencias significativas en el índice de proliferación entre las diferentes condiciones de cultivo donde las células Tregs-AE fueron estimuladas con CDs-mo alogénicas. Tomando en cuenta que tanto la IL-12 como la IL-15 tienen la capacidad de inducir la supervivencia de linfocitos T (74), también se analizó el porcentaje de viabilidad de las células Tregs en co-cultivo con la finalidad de descartar muerte entre las diferentes condiciones. Similar a los anteriores resultados, no hubo diferencias significativas en la viabilidad de las células Tregs-AE estimuladas con CDs-mo e IL-2 en presencia o ausencia de IL-15 (Fig. 8 D). Es importante resaltar que en los co-cultivos de Tregs:CDs-mo alogénicas con IL-2 (250 U/mL) ± IL-15 (10 ng/mL) tenían una tendencia a presentar un mayor índice de proliferación y viabilidad en comparación con las otras condiciones con IL-2 (500 y 1000 U/mL) ± IL-15 (Fig. 8 C y D). Por otra parte, cabe resaltar que al cultivar las células Tregs CD25^{hi}CD127^{lo} con sólo IL-2 (1000 U/mL) o IL-2 (1000 U/mL) + IL-15 (10 ng/mL) no se indujo proliferación celular (Fig. 8 E).

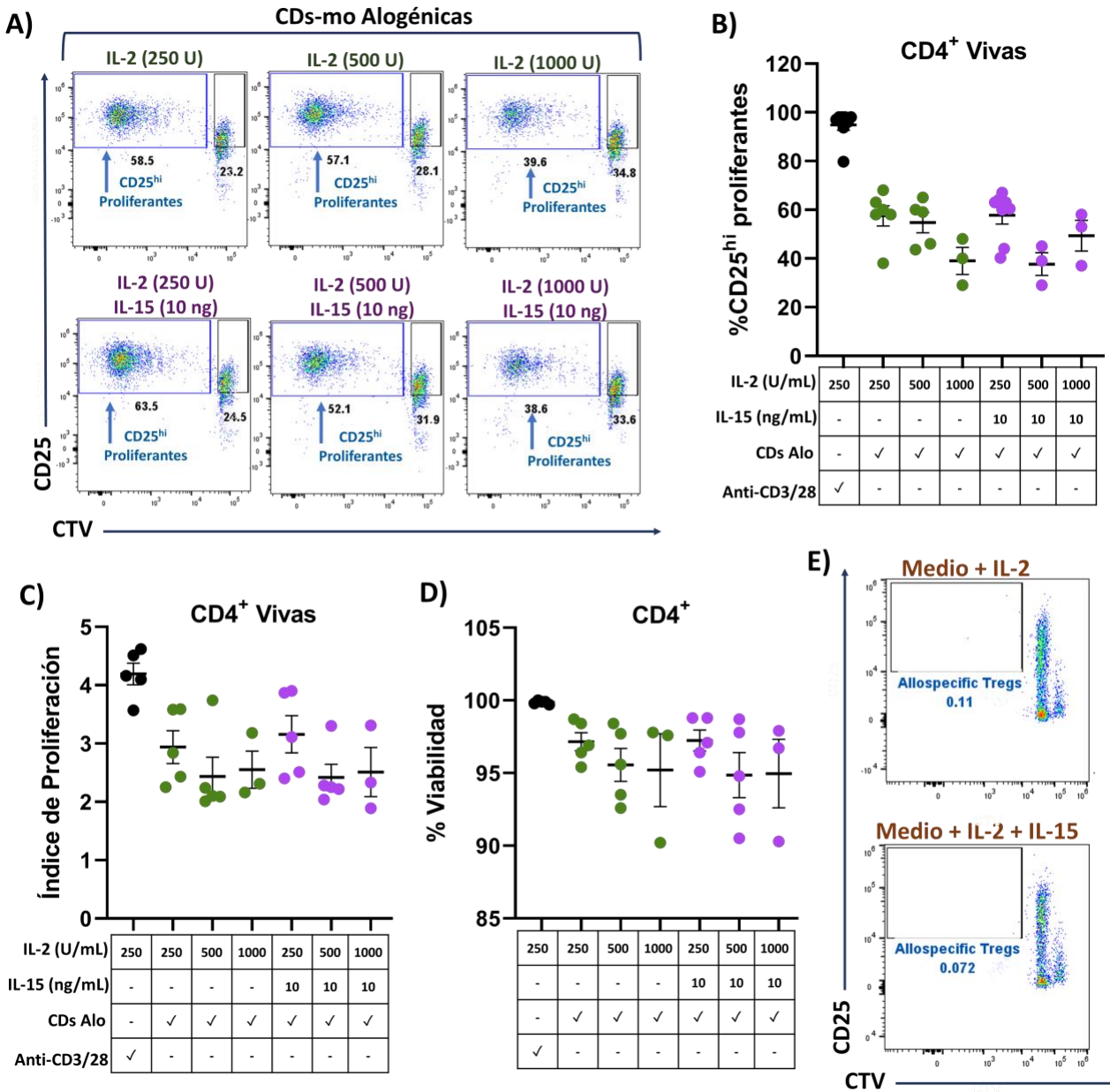
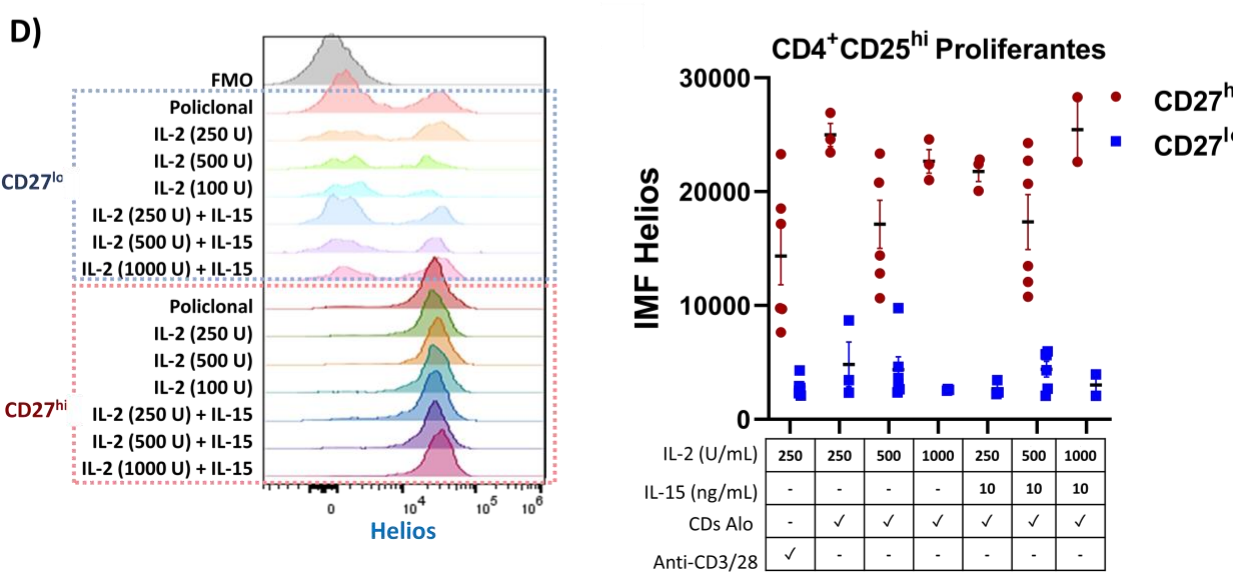
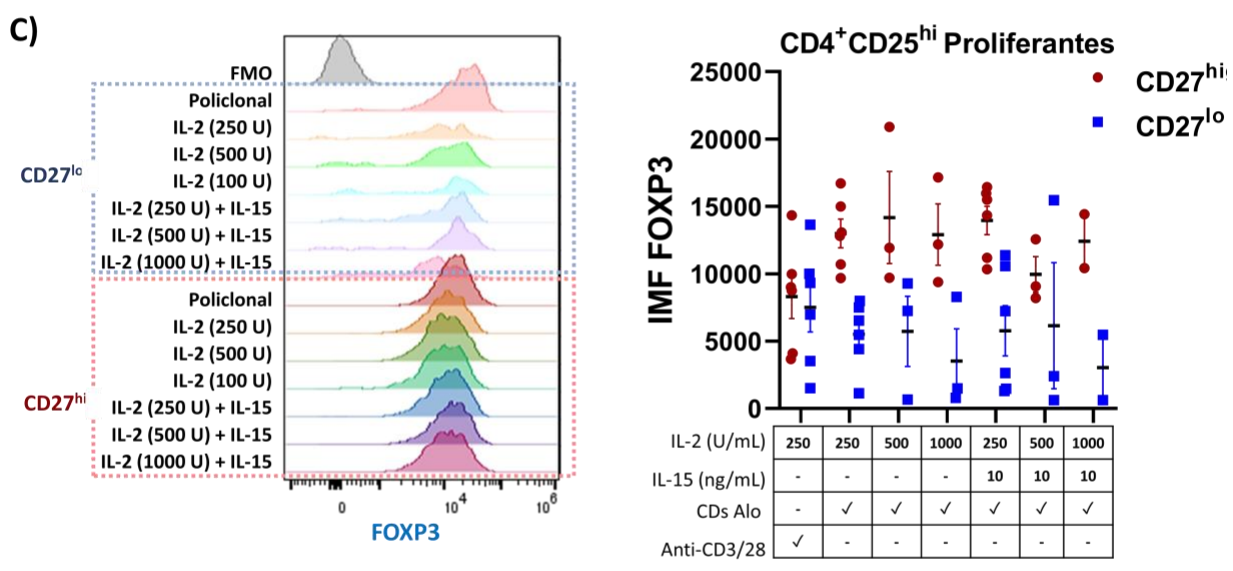
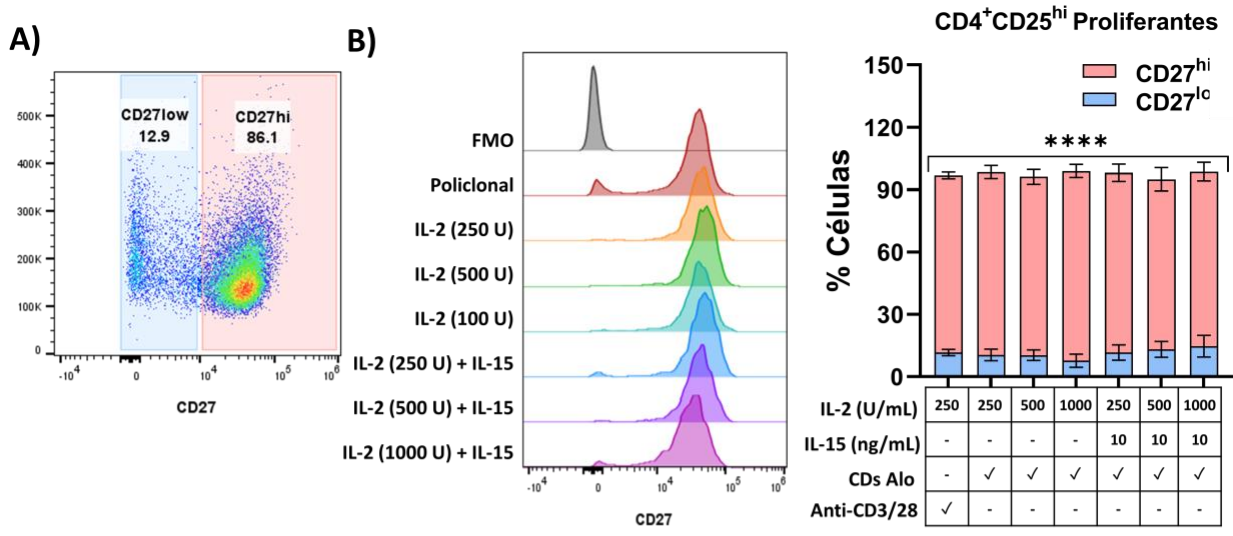


Figura 8. Células dendríticas inducen la proliferación de células Tregs CD27^{hi} aloantígeno específicas en presencia de IL-2 e IL-15. Para la expansión de células Tregs-AE, se co-cultivaron células T CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo} (marcadas con CTV) con CDs-mo alogénicas y ácido retinoico en distintas concentraciones de IL-2 (250-1000 U/mL) y una concentración de IL-15 (10 ng/mL); en el día 7, se evaluó la proliferación celular mediante FACS. A) Se muestra un experimento representativo de la proliferación de las Tregs (determinada por la disminución de la fluorescencia de CTV y alta expresión de CD25) con los distintos estímulos (ver estrategia de análisis en Fig. Suplementaria D). B) No se encontró una diferencia significativa en el porcentaje de células Tregs CD4⁺CD25^{hi} proliferantes entre las diferentes condiciones de cultivo. C) No hubo diferencias significativas en el índice de proliferación entre las diferentes condiciones de cultivo. D) El porcentaje de viabilidad de células T CD4⁺ en todas las condiciones se encontró en promedio arriba del 95%. E) En ausencia de CDs-mo, el cultivo de Tregs CD25^{hi}CD127^{lo} con AR, IL-2 e IL-15 no inducen la proliferación. Anti-CD3/CD28 se presenta como control positivo para inducir proliferación. Los resultados se muestran como la Media ± EEM. El análisis estadístico en B-D se realizó utilizando ANOVA de una vía.

9.3. Células Tregs-AE CD27^{hi} tienen mayor expresión de FOXP3 y Helios

Dos estudios publicados describieron que después de estímulo primario con anti-CD3/CD28 (143) o con CMNs de sangre periférica alogénicas (136), puede ser distinguida una subpoblación de células Tregs caracterizada por una expresión de CD27 alta (CD27^{hi}) las cuales poseen una mayor capacidad supresora *in vitro* e *in vivo* y mantienen su fenotipo inmunorregulador después de un estímulo secundario (expansión) prolongado (3-4 semanas). En el presente trabajo evaluamos si después de un estímulo primario con CDs-mo alogénicas, AR e IL-2 en presencia o ausencia de IL-15, las células Tregs que se activaron, proliferaron y expresaron CD27. Los resultados muestran que los linfocitos Tregs-AE contienen una mayor proporción de células CD27^{hi} (>85%) comparada con las células CD27^{lo} (<15%) (Fig. 9 A y B), y de manera notable, la frecuencia de células Tregs-AE CD27^{hi} fue similar entre las diferentes concentraciones de IL-2 en presencia o ausencia de IL-15 (Fig. 9B). Para continuar con la caracterización de la subpoblación de Tregs-AE CD27^{hi}, se evaluó la expresión FOXP3 y Helios (C-F). En concordancia con el trabajo de Arroyo y colaboradores (143), la subpoblación de Tregs-AE CD27^{hi} presenta un incremento significativo en la expresión (IMF) de FOXP3 (Fig. 9C) y Helios (Fig. 9D) comparado con su contraparte CD27^{lo} en todos los cultivos evaluados. Interesantemente, la expresión de FOXP3 (Fig. 9C) y Helios (Fig. 9D) fue similar entre las células Tregs expandidas en presencia o ausencia de IL-15. Asimismo, no encontramos diferencias significativas en la proporción de células FOXP3⁺ (Fig. 9E) y Helios⁺ (Fig. 9F) en las Tregs-AE CD27^{hi} al comparar los cultivos con IL-2 o con IL-2+IL-15.

Para evaluar el efecto de la IL-2 + IL-15 sobre la proliferación y el fenotipo de las células Tregs-AE CD27^{hi} durante una estimulación policlonal (anti-CD3/CD28) prolongada, se prosiguió a realizar su purificación por citometría de flujo. Los números totales obtenidos de células Tregs-AE CD27^{hi} tras un estímulo primario con CDs alogénicas fue ligeramente mayor en la condición de IL-2 (250 U/mL) + IL-15 (10 ng/mL) comparadas con otras condiciones, sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Fig. 9G). Posteriormente, las células Tregs CD25^{hi}CD27^{hi} en proliferación purificadas recibieron un estímulo secundario que consistió en tres semanas de expansión policlonal, de acuerdo a nuestro protocolo recientemente publicado (138) (ver Fig. 5). A través de cada ciclo, hubo una mayor proliferación de las células Tregs-AE CD27^{hi} estimuladas con IL-2 (250 U/mL) y con IL-2 (250 U/mL) + IL-15 (10 ng/mL), con un incremento relativo de 251 ± 143 y 574 ± 192 , respectivamente, hasta el día 21 (Fig. 9H). Por consiguiente, al obtener un número suficiente de células Tregs-AE expandidas en las dos condiciones previamente mencionadas, se prosiguió a continuar con los demás ensayos.



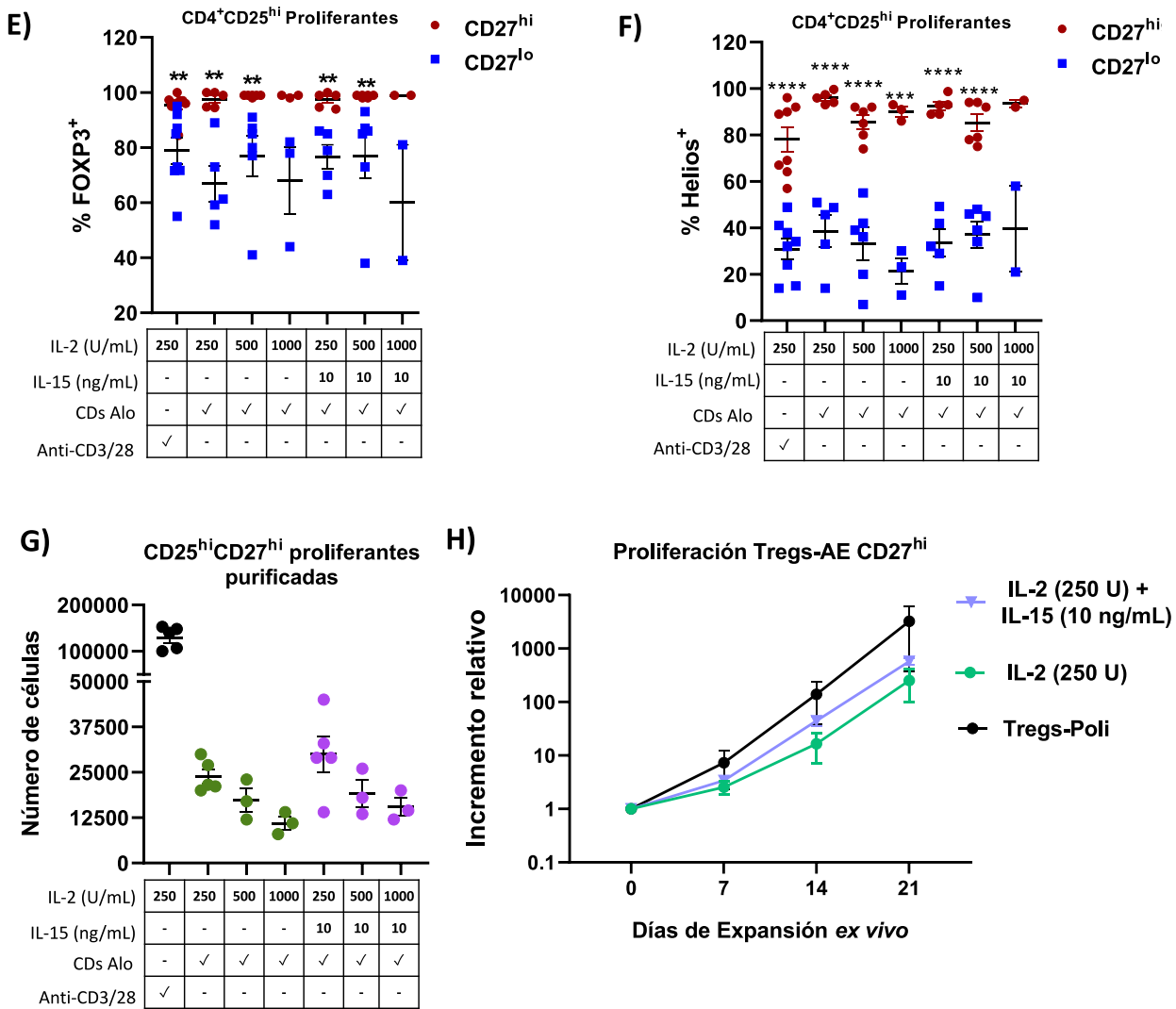


Figura 9. Las células Tregs-AE CD27^{hi} expresan mayores niveles de FOXP3 y Helios. Para la caracterización de las células Tregs CD25^{hi} proliferantes (AE) generadas *in vitro* (ver figura 8): en el día 7 de cultivo con CDs-mo (estímulo primario) se evaluó la expresión de CD27 mediante citometría de flujo (A-F); se realizó la purificación de las Tregs CD25^{hi}CD27^{hi}CTV^{lo} por FACS (G, ver Fig. Supl. D) y se realizó su expansión policlonal con anti-CD3/CD28, rapamicina, TGF, IL-2 ± IL-15 (ver Fig. 5). A-B) Las Tregs-AE CD25^{hi} contienen un incremento de la proporción de células CD27^{hi} comparado con las células CD27^{lo} en todas las condiciones. C-D) Las Tregs-AE CD25^{hi}CD27^{hi} presentan mayores intensidades medianas de fluorescencia (IMF) de FOXP3 (C) y Helios (D) comparado con las Tregs CD27^{lo}, además no hay diferencias significativas en la IMF dentro de la población de CD27^{hi} entre las condiciones. E-F) Las Tregs-AE CD25^{hi}CD27^{hi} tienen una mayor proporción de FOXP3⁺ (E) y Helios⁺ (F). G) Números totales de Tregs-AE CD27^{hi} purificadas al día 7 de expansión con CDs alogénicas en las distintas condiciones de IL-2 ± IL-15. H) Cinética de crecimiento de la proliferación de células Tregs-AE CD27^{hi} purificadas a través de los tres ciclos de expansión policlonal; solo las condiciones de IL-2 (250 U) (color verde) y de IL-2 (250 U) + IL-15 (10 ng/mL) (color lila) se mantuvieron hasta las tres semanas de expansión, donde en esta última se obtuvo una mayor proliferación; el incremento relativo se calculó al dividir el número total de Tregs al final de la expansión entre el número de Tregs en el día de la purificación. Se muestra un experimento representativo en los incisos A-D. Anti-CD3/CD28 se presenta como control positivo de proliferación en B-G. Los resultados se muestran como la Media ± EEM. El análisis estadístico se realizó utilizando t de Student no pareada (incisos B, D y F) y ANOVA de una vía (B, D, F, G). Las diferencias significativas se indican como **p<0.001, ***p<0.0001, ****p<0.00001.

9.4. Células Tregs-aloespecíficas CD27^{hi} expandidas a largo plazo con IL-2 + IL-15 mantienen su fenotipo inmunosupresor

La estimulación prolongada por el TCR de las células Tregs *in vitro* puede resultar en una pérdida significativa de la expresión de FOXP3 (147). Para evaluar el efecto de una estimulación policlonal (3 semanas) en el fenotipo de las células Tregs CD27^{hi}, se estudiaron los niveles de expresión de diversos marcadores inmunosupresores. Las células Tregs-AE CD27^{hi} expandidas tres semanas con 250 U/mL de IL-2 [Treg-AE (IL-2)] y con 250 U/mL IL-2 + 10 ng/mL IL-15 [Treg-AE (IL-2/IL-15)] presentaban un alto porcentaje de células CD25⁺FOXP3⁺ (Fig. 10 A y B: $94.9 \pm 3.5\%$ y $94.6 \pm 2.6\%$, respectivamente) pero similar entre ambas condiciones. De manera equivalente, no hubo diferencia en la expresión (IMF) de FOXP3 (Fig. 10 C) y CD25 (Fig. 10 D) entre las células Tregs-AE (IL-2) y Tregs-AE (IL-2/IL-15). Debido a que linfocitos T no reguladores pueden expresar algunos marcadores de Tregs (FOXP3, CD25, CD39, CTLA-4, LAG-3) de manera transitoria tras una activación, utilizamos a células T CD4⁺CD25⁻CD45RA⁺ estimuladas con anti-CD3/CD28 e IL-2 (Tconv) como grupo control. De manera importante, las células Tregs-AE expandidas tuvieron un incremento significativo tanto en la proporción de células CD25⁺FOXP3⁺ (Fig. 10 B) como en la expresión de FOXP3 (Fig. 10 C) y CD25 (Fig. 10 D) comparada con las células Tconv estimuladas.

CD39 es una ectoenzima implicada en la generación de la adenosina, la cual inhibe funciones efectoras de CDs y linfocitos Tconv (85,86). Comparado con células Tregs-AE (IL-2), las células Tregs-AE (IL-2/IL-15) presentaron una mayor expresión (IMF) de CD39 (Fig. 10 E: 1728 ± 734 vs 4385 ± 1985) e incremento en frecuencia de células CD39⁺ (Fig. 10 F: $41.8 \pm 39.7\%$ vs $91.5 \pm 8.5\%$). Adicionalmente, las células Tregs CD27^{hi} aloantígeno-específicas y policlonales expandidas mostraron un incremento significativo en la expresión de Helios comparado con los linfocitos Tconv (Fig. 10 G y H). Interesantemente, los resultados mostraron que, en comparación con las células Tregs-AE (IL-2), las células Tregs-AE (IL-2/IL-15) presentan una tendencia a incrementar la IMF de Helios (Fig. 10 G: 2335 ± 346 vs 4436 ± 3443) y proporción de Helios⁺ (Fig. 10 H: $53.7 \pm 11.5\%$ vs $69.6 \pm 11.5\%$). CTLA-4 y LAG-3 son dos moléculas involucradas en la supresión de CDs mediada por linfocitos Tregs (77,78,79,80). De manera importante, las células Tregs CD27^{hi} expandidas presentaron un incremento significativo en la IMF de CTLA-4 (Fig. 10 I, >1200) y proporción de linfocitos CTLA-4⁺ (Fig. 10 J, >91%) que los linfocitos Tconv activados (<170 y <40%, respectivamente). Por otra parte, no encontramos diferencias significativas en la expresión de LAG-3 (Fig. 10 K) entre los diferentes subtipos de células T expandidos, además, la frecuencia de LAG-3⁺ fue baja entre todos los linfocitos (Fig. 10 L, <30%)

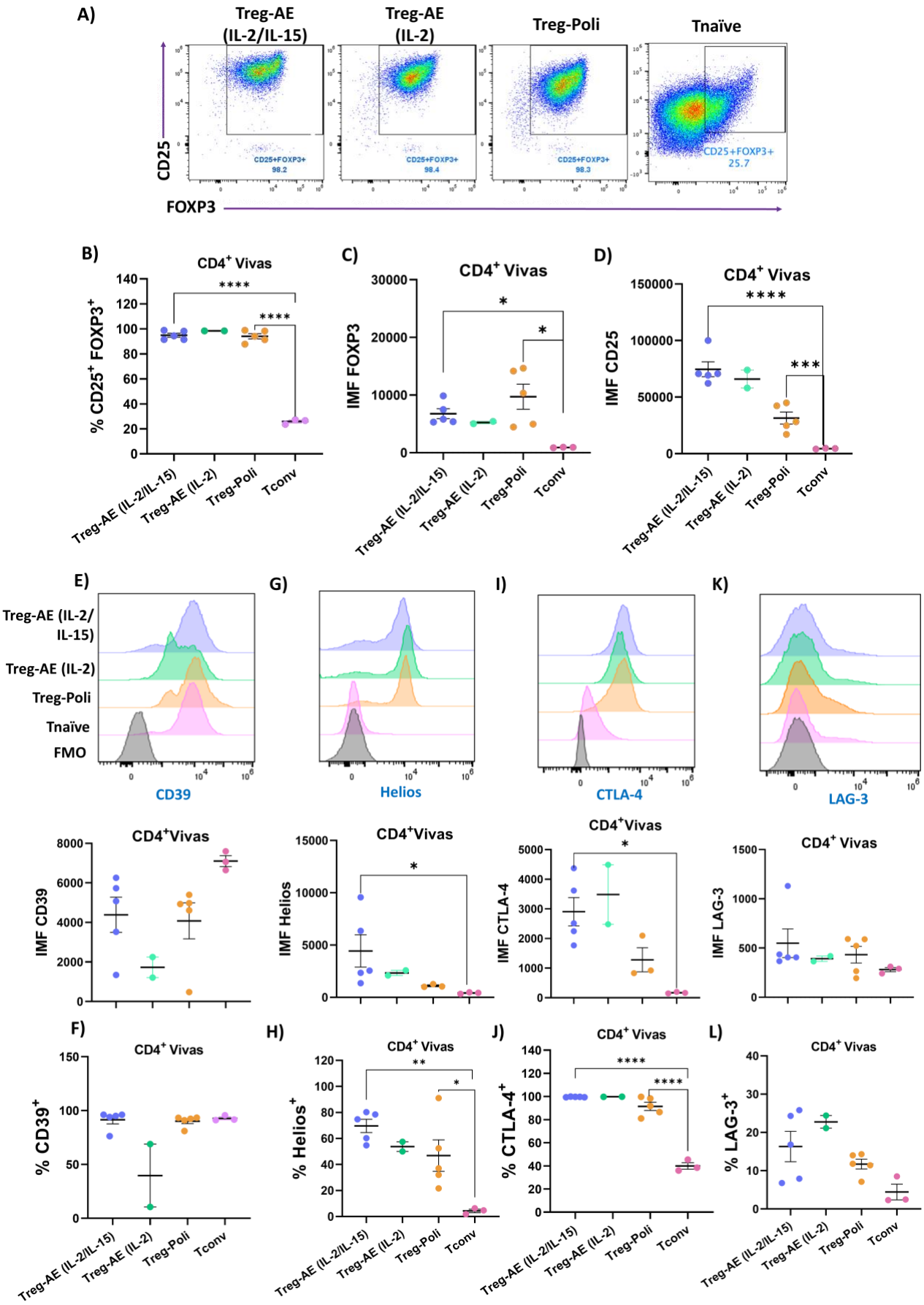


Figura 10. Células Tregs-AE CD27^{hi} expansión policlonalmente con IL-2 + IL-15 a largo plazo mantienen la expresión de marcadores inmunorreguladores. Tras tres semanas de expansión policlonal, se analizaron las células Tregs-AE CD27^{hi} expandidas con IL-2 + IL-15 (Treg-AE (IL-2/IL-15)), Tregs-AE con IL-2 (Treg-AE (IL-2)), Tregs policlonales (Treg-Poli) y células Tnaïve activadas (Tconv). A-D) Las Tregs expandidas tienen mayor porcentaje de células CD25⁺FOXP3⁺ (A y B), así como la expresión de FOXP3 (C) y CD25 (D) comparadas con las células Tconv. E-L) Las células Tregs expandidas presentan una alta expresión (IMF) y proporción de células positivas para CD39 (E y F), Helios (G y H) y CTLA-4 (I y J), pero baja expresión de LAG-3 (K y L). Se presenta un experimento representativo en A, E, G, I y K. En E, G, I y K. Se utilizó FMO como control representado en los histogramas. Ver estrategias de análisis en la Fig. Sup. E. Los resultados se muestran como Media ± EEM. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de una vía. Las diferencias significativas se indican como *p<0.05, **p<0.0001, ****p< 0.001.

La expresión de receptores de quimiocinas en las células Tregs es esencial para su migración a los tejidos donde deben ejercer sus funciones inmunorreguladoras. Receptores como CCR2, CCR4 y CXCR3 son importantes para la localización de las células Tregs en el aloinjerto (111). En este estudio se evaluaron distintos receptores de quimiocinas presentes en las células Tregs CD27^{hi}. No se encontraron diferencias significativas entre las células Tregs-AE CD27^{hi} expandidas policlonalmente con IL-2 ± IL-15 en la IMF o frecuencia de células positivas para CCR2 (Fig. 11 A y B), CCR4 (Fig 11. C y D) y CXCR3 (Fig.11 E y F). Sin embargo, las células Tregs-AE y Tregs-Poli expandidas policlonales presentaron un incremento en la frecuencia de células CCR2⁺ (>70%, Fig. 11 B) y CCR4⁺ (>98%, Fig. 11 D) comparado con las células Tconv activadas (51.4% y 95.1%, respectivamente, Fig. 11 B y D), siendo esta diferencia significativamente mayor en la proporción de células CCR4⁺. La figura 11F, muestra que todos los linfocitos T estimulados *in vitro* tienen un alto porcentaje de CXCR3 (>58%), pero no hubo diferencia significativa entre ellos.

La expresión de CCR7 es necesaria para la migración de células Tregs a los nódulos linfáticos (119). Como se observa en la figura 11, las células Tregs-AE (IL-2/IL-15) presentaron en promedio una mayor intensidad en la mediana de fluorescencia de CCR7 (11G, 1401 ± 1053) y porcentaje de CCR7⁺ (11H, 42.9 ± 37.1%) comparado con las células Tregs-AE (IL-2) (548 ± 122 IMF de CCR7 y 9.9 ± 4.2% de CCR7⁺), Tregs-Poli (672 ± 297 IMF de CCR7 y 20.1 ± 15.2% de CCR7⁺) y Tconv (191 ± 45 IMF de CCR7 y 1.9 ± 0.6% de CCR7⁺) aunque debido a la gran variabilidad no de manera significativa.

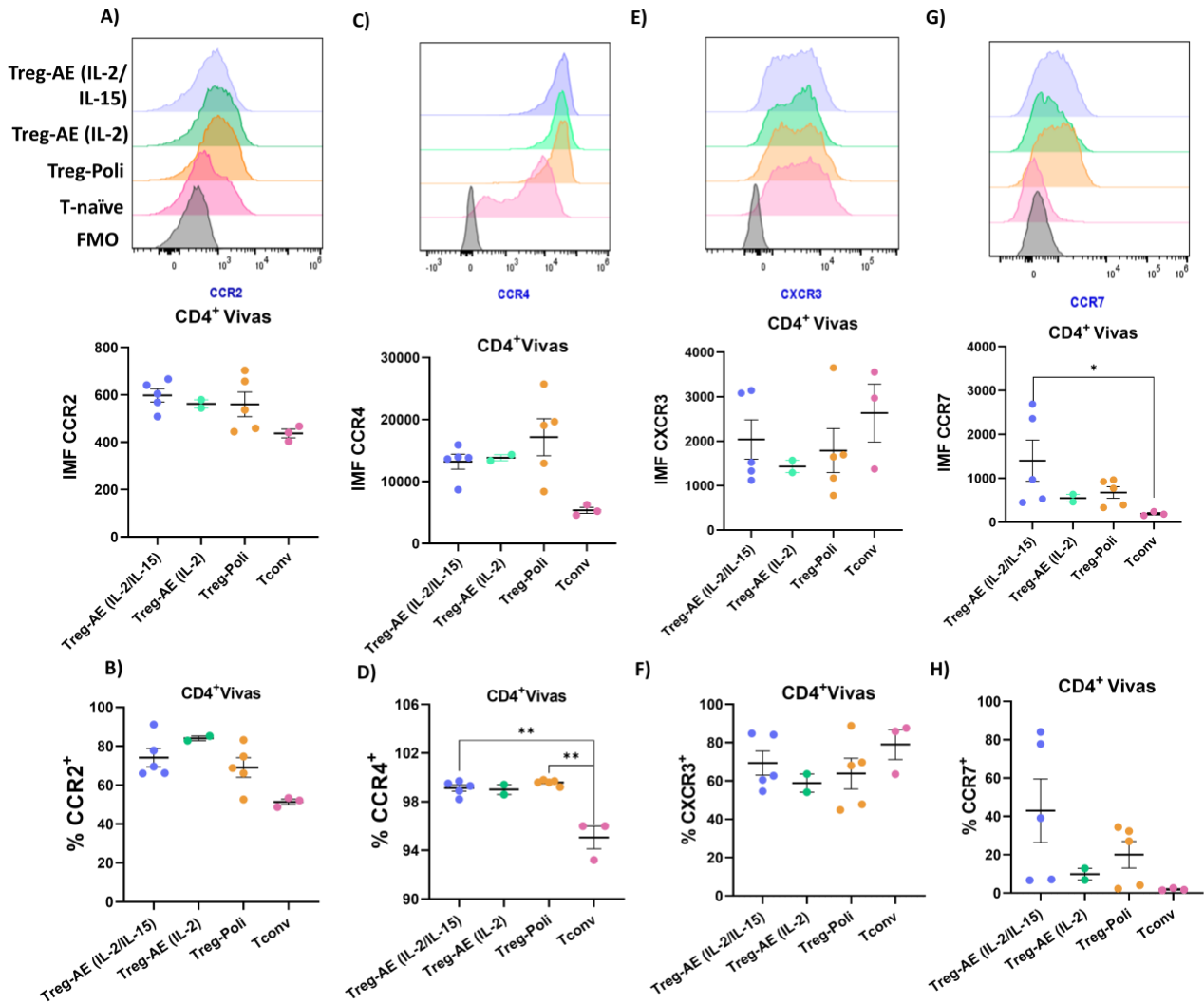


Figura 11. Células Tregs-AE CD27^{hi} expandidas policlonalmente con IL-2 + IL-15 a largo plazo presentan altos niveles de CCR2, CCR4 y CXCR3. Mediante citometría de flujo, se evaluó la expresión de receptores de quimiocinas en las células Tregs CD27^{hi} expandidas policlonalmente durante tres semanas. Las Tregs muestran un alto porcentaje de células CCR2⁺ (A y B), el porcentaje de células CCR4⁺ es mayor en todas las células Treg y es menor en las células Tconv (C y D), y de células que expresan CXCR3⁺ (E y F). En cuanto al porcentaje de células CCR7⁺ fue baja, aunque mayor en Tregs-AE (IL-2/IL-15) que en cualquier otra (G y H). Se presenta un experimento representativo en A, C, E y G, y FMO como control representado en color gris en los histogramas. Ver estrategia de análisis en la Fig. Supl. E. Los resultados se muestran como Media ± EEM. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de una vía. Las diferencias significativas se indican como **p < 0.001.

9.5. Células Tregs-AE CD27^{hi} expandidas suprimen la proliferación de células Tconv de manera aloantígeno-específica

Las células Tregs-AE CD27^{hi} expandidas *ex vivo* en presencia de IL-2 + IL-15, fueron puestas a prueba en cultivos *in vitro* para evaluar su capacidad reguladora. Como un control adicional para estos ensayos, se utilizaron Tregs (No-aloespecíficas, NAE) expandidas que fueron aisladas de los cocultivos de Tregs CD25^{hi}CD127⁻ (marcadas con CTV) con CDs-mo alogénicas y que no habían proliferado (CTV⁺CD25^{hi}CD27^{hi}). Primero, se demostró que las células Tregs-AE (IL-2), Tregs-AE (IL-2/IL-15), Tregs-Policlonales (Tregs-Poli) y Tregs no aloantígeno específicas (Tregs-NAE) fueron capaces de suprimir la proliferación de las células Tconv CD4⁺ y CD8⁺ ante un estímulo policlonal en una proporción 1:1 Tregs:Tconv (Fig. 12 A).

A continuación, se evaluó su capacidad supresora antígeno-específica mediante dos enfoques:

1. Se analizó la supresión inducida por células Tregs-AE (IL-2), Tregs-AE (IL-2 + IL-15), Tregs-Policlonales (Tregs-Poli) y Tregs no aloantígeno específicas (Tregs-NAE) sobre la proliferación de células Tconv estimuladas con CDs alogénicas. Los resultados muestran que las células Tregs-AE CD27^{hi} expandidas *ex vivo* en presencia (IL-2/IL-15) o ausencia (IL-2) de IL-15 inhiben de manera significativa la proliferación de células Tconv CD4⁺ y CD8⁺ desde las proporciones 1:1 Tregs:Tconv (% de supresión >79% y >60%, respectivamente) hasta 1:27 (% de supresión >45% y >60%, respectivamente) (Fig.12 B). En contraste, las Tregs-Policlonales y las Tregs-NAE presentaron menor capacidad de supresión desde las proporciones 1:1 (<60% para CD4⁺ y <55% para CD8⁺) hasta las 1:27 (<40% para CD4⁺ y <30% para CD8⁺) (Fig. 12 B).
2. Se evaluó la especificidad de las Tregs-AE CD27^{hi} expandidas, mediante un ensayo en el que se comparó su capacidad supresora al ser activadas con células dendríticas alogénicas empleadas al inicio de su expansión (CDs-Alo) versus CDs alogénicas de un individuo no relacionado (CDs-3^{ro}). Notablemente, en una proporción 1:1 Tregs:Tconv tanto las células Tregs-AE (IL-2/IL-15) como las células Tregs-AE (IL-2) fueron capaces de suprimir la proliferación de células Tconv CD4⁺ y T CD8⁺ de manera significativamente mayor cuando fueron estimuladas con CDs-Alo (>79% y >60% respectivamente) en comparación con los cocultivos con CDs-3^{ro} (<41% para T CD4⁺ y <31% para T CD8⁺) (Fig.12 C).

En conjunto, nuestros resultados muestran que las Tregs-AE CD27^{hi} expandidas suprimen de manera aloantígeno específica.

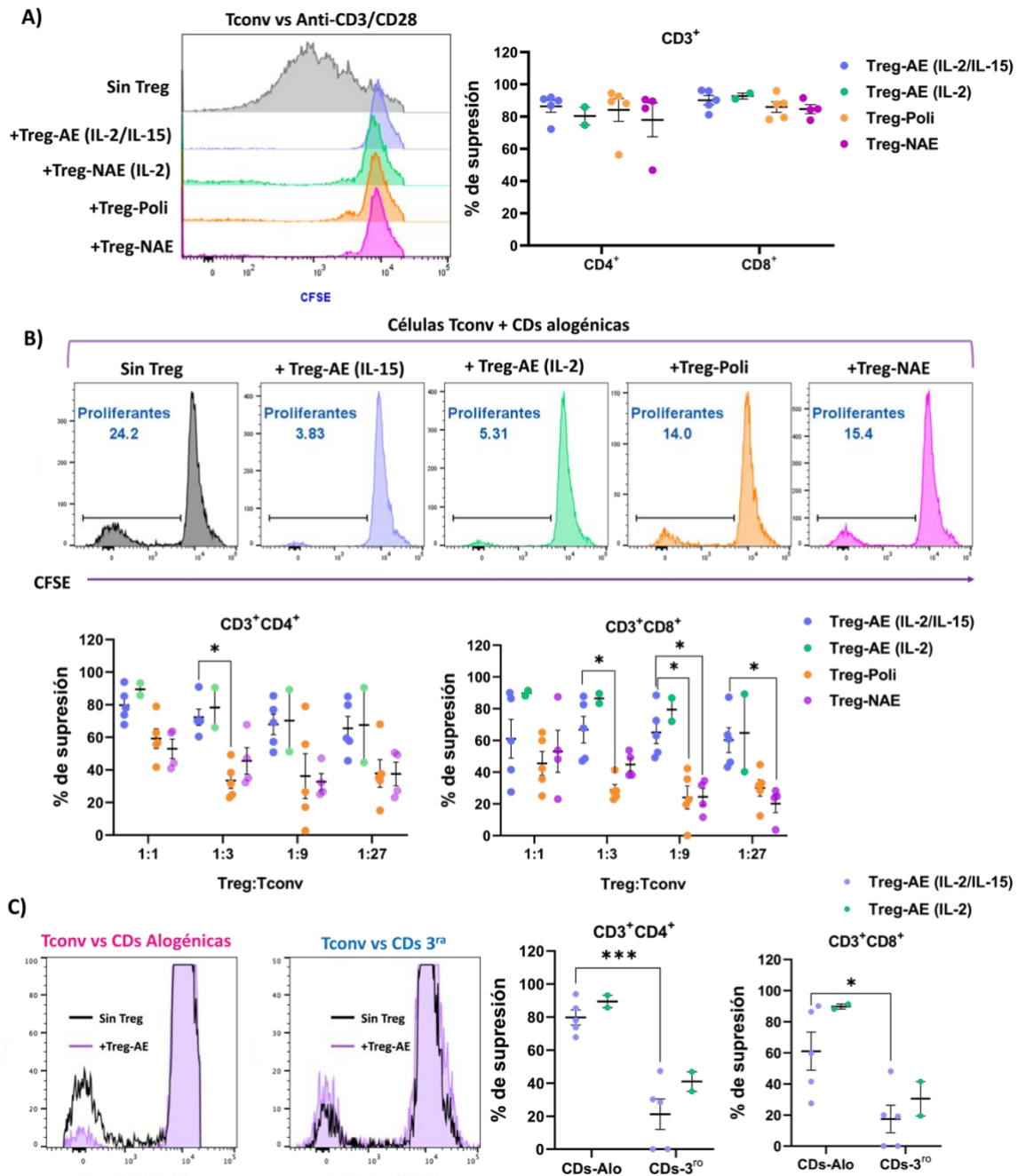


Figura 12. Las células Tregs-AE CD27^{hi} expandidas *ex vivo* suprimen la proliferación de células Tconv de manera aloantígeno específica. Después de tres semanas de expansión policlonal, las Tregs-AE se cocultivaron con células Tconv (marcadas con CFSE) en diferentes proporciones de células Tregs:Tconv y estimularon con anti-CD3/CD28 o CDs-mo (B y C). A) Células Tregs expandidas en distintas condiciones, suprimen tanto células T CD4⁺ como T CD8⁺ policlonales. B) Las células Tregs-AE expandidas con IL-2 (IL-2) o IL-2+IL-15 (IL-15) suprimieron en mayor medida la proliferación de células T CD4⁺ y CD8⁺ aloespecíficas, comparado con Tregs policlonales (Poli) o que las Tregs No-aloespecíficas (NAE). C) Las células Tregs-AE (IL-2) e (IL-15) inhiben la proliferación de los linfocitos Tconv sólo cuando se cultivan con las CDs alogénicas con las que fueron inicialmente estimuladas (Alo) pero no cuando se cultivan con las CDs-mo no relacionadas (3^{ro}). Se muestra un experimento representativo de A-C. Los resultados se muestran como Media \pm EEM. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de una vía (A,B) y t de Student no pareada (C). Las diferencias significativas se indican como * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

9.6. La expansión de células Tregs-AE con IL-2 + IL-15 mantiene una alta pureza de CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺

Por último, se evaluó la pureza de las células Tregs CD27^{hi} expandidas en presencia o ausencia de IL-15 (148), tomando en cuenta que esta citocina puede inducir la proliferación de otras subpoblaciones de linfocitos T (149,150). Es importante resaltar que, con el protocolo empleado en este trabajo, las células Tregs-AE CD27^{hi} expandidas policlonalmente presentaron una viabilidad promedio mayor del 96% (Tabla 6). Además, dentro de la población de linfocitos Tregs viables hubo una mínima contaminación de células T CD3⁺CD8⁺ (<1.5%), linfocitos B CD19⁺ (<0.53%) y monocitos CD14⁺ (<0.63%). Y más importante, la mayoría de las células T CD4⁺ fueron CD25⁺FOXP3⁺ (>94.5%, Tabla 6), demostrando que en este trabajo se obtuvo una alta pureza de células Tregs-AE CD27^{hi} expandidas en presencia o ausencia de IL-15.

Tabla 6. Pureza de las células Tregs-AE CD27^{hi} expandidas.

Muestra	% Viabilidad	% CD3 ⁺	% CD3 ⁺ CD4 ⁺	% CD3 ⁺ CD8 ⁺	% CD19 ⁺	% CD14 ⁺	% CD25 ⁺ FOXP3 ⁺
Células Tregs-AE IL-2 (250 U/mL)							
M4	98.7	98.3	99.6	1.45	0.18	0.19	93.75
M5	98.5	95.4	99.7	1.24	0.22	0.058	96
Media	98.6	96.85	99.65	1.345	0.2	0.124	94.9
Células Tregs-AE IL-2 (250 U/mL) + IL- 15 (10 ng/mL)							
M1	93.9	88.5	94.8	0.76	0.29	0.52	93.3
M2	94.5	92.6	93.1	0.55	0.15	0.06	90.75
M3	96	94.4	94.1	0.91	0.22	0.05	91.5
M4	98.9	96.7	98.7	1.72	0.37	0.63	98.65
M5	99	96.6	98.5	2.01	0.53	0.35	98.55
Media	96.46	93.76	95.84	1.19	0.31	0.323	94.55
DE	2.40	3.40	2.59	0.64	0.15	0.26	7.32

10. Discusión

Un punto crítico para considerar en los ensayos clínicos basados en el uso de linfocitos T reguladores humanos es asegurar una alta pureza de las células obtenidas, debido a que no existe un marcador específico de Tregs expresado extracelularmente. En este estudio se realizó el aislamiento de células Tregs a partir de CMNs basados en la alta expresión de CD25 y la baja expresión de CD127, ya que se ha demostrado que esta subpoblación permite obtener células Tregs con mayor pureza y mayor expresión de FOXP3 en comparación con el aislamiento de células T CD4⁺CD25⁺ (151,152). Además, es importante resaltar una diferencia entre los protocolos de aislamiento que se han empleado. En algunos protocolos utilizan la separación inmunomagnética por columna (MACS), sin embargo, la pureza de las células Tregs por este método ha sido subóptima al exhibir una mayor contaminación con células Tconv, células NKs y células B (130,132). El uso del citómetro de flujo (FACS) es otra alternativa que se ha propuesto por parte de nuestro grupo (138) y otros (153,154), dado que tiene la ventaja de poder incorporar más marcadores celulares e incluso es posible evaluar la viabilidad y la proliferación celular basado en el marcaje con colorantes vitales como CFSE o CTV. Tomando en cuenta lo anterior, en este trabajo realizamos la purificación inicial de células Tregs CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻ y posteriormente las Tregs-AE CD25^{hi}CD127⁻ en proliferación (CTV^{low}) mediante el uso de la citometría de flujo, y de manera importante se obtuvieron purezas mayores al 94% al finalizar el protocolo de expansión (Tabla 6). Aunado a lo anterior, se ha reportado que el producto celular obtenido por FACS es seguro para ser usado en ensayos clínicos basados en la transferencia adoptiva de linfocitos Tregs (153,154).

Para expandir células Tregs aloespecíficas (AE), se han utilizado diversas células presentadoras de antígeno incluyendo células B activadas con CD40L (155) o células dendríticas (121,122,123,124,133). Estos estudios han demostrado que las CD expanden de manera más eficiente a las células Tregs-AE a partir de poblaciones total policlonales, además les confiere una supresión más potente y específica de antígeno (156). La alta expresión de moléculas de HLA-DR y CD86 en las células dendríticas derivadas de monocitos empleadas en la presente tesis, se correlacionó con su gran capacidad para inducir la proliferación *in vitro* de linfocitos Tregs CD25^{hi}CD127⁻ a los siete días de cultivo.

Con el fin de promover una mayor proliferación de células Tregs-AE inducida por CDs, se utilizó IL-15 exógena junto a la IL-2 en nuestros cultivos. Aunque otros artículos reportaron una mayor proliferación de las células Tregs estimuladas con CDs en presencia de IL-2 e IL-15 en comparación

con únicamente IL-2 (83,132,135,146), en los resultados no se observó ese mismo efecto sinérgico a los siete días de co-cultivo (Figura 9). Las diferencias con nuestros resultados podrían deberse a los tiempos de incubación *in vitro*, las concentraciones de IL-2, el tipo de célula Treg purificada, la maduración de las CDs y a otros agentes empleados como ácido retinoico (AR) o rapamicina. Por ejemplo, un trabajo reportó que al usar una baja dosis de IL-2 (10 U/mL) más IL-15 (10 ng/mL) se promueve una mayor proliferación de células Tregs CD4⁺CD25⁺ al ser estimuladas con CDs-mo inmaduras durante 5 días de cultivo (83). Por otra parte, tres estudios independientes (132,134,135) demostraron que en la expansión de células Tregs CD25^{hi} o CD25^{hi}CD127⁻ con CDs maduras (11-21 días) y empleando un amplio rango de concentraciones de IL-2 (10-2000 U/mL), la adición de IL-15 (10 ng/mL) fue crítica para inducir la máxima expansión de células Tregs en presencia de rapamicina (100 µM), pero es prescindible en ausencia de rapamicina. Estas investigaciones sugieren que podría existir un efecto sinérgico de IL-2 más IL-15 cuando se utilizan bajas concentraciones de IL-2 (<25 U/mL) y/o en presencia de rapamicina. Aunado a lo anterior, nuestro protocolo también hace uso del ácido retinoico, el cual mantiene la expresión de FOXP3 en las células Tregs y su función supresora *in vitro* o *in vivo* en presencia de citocinas proinflamatorias (157). Previamente nuestro grupo de trabajo había demostrado que a los siete días de co-cultivo con CDs-mo e IL-2 (500 U/mL), el ácido retinoico favorece una mayor proliferación de células Tregs comparado con el uso de rapamicina y estas Tregs mantienen la expresión de FOXP3 (138). En este contexto, el AR promueve la acumulación de H3K9Ac y H3K4me3 y la disminución de la metilación de sitios CpG en el locus del gen *Foxp3* (157). Además, el AR previene la degradación de FOXP3 al regular a la baja la expresión de la ubiquitina ligasa *Stub1* en células Tregs activadas (157). Cabe resaltar que en el presente trabajo demostramos que en ausencia de CDs-mo, el cultivo de las células Tregs CD25^{hi}CD127⁻ con AR, IL-2 ± IL-15 no indujo la proliferación celular, demostrando la aloespecificidad de las células Tregs-AE aisladas. En conjunto, esto explicaría porqué no observamos una diferencia en la proliferación de las células Tregs en co-cultivo con CDs-mo alogénicas utilizando altas concentraciones de IL-2 (250-1000 U/mL) en presencia o ausencia de IL-15 (10 ng/mL), además de que empleamos CDs maduras.

CD27 es una molécula coestimuladora miembro de la superfamilia del receptor de TNF-α presente en las células Tregs, cuya expresión se ha correlacionado con su estado de activación y su función inmunosupresora (158). En este trabajo se describe por primera vez que después de una semana de estimulación con CDs alogénicas en presencia de AR, las células Tregs-AE CD27^{hi} generadas tienen una mayor expresión de FOXP3 y Helios, ambos factores de transcripción importantes para regular diversos mecanismos de supresión de las células Tregs y esenciales para mantener su identidad

inmunorreguladora (88,159). Nuestros resultados concuerdan con los resultados de dos estudios publicados donde describieron que después de una activación con anti-CD3/CD28 (143) o con CMNs alogénicas (136), las células Tregs CD27^{hi} poseen una mayor capacidad supresora tanto *in vitro* como *in vivo*, lo cual se correlacionó con una mayor expresión de FOXP3, Helios y otros marcadores (143). De manera importante, no encontramos una diferencia significativa en la proporción de células Tregs-AE CD27^{hi} en las distintas concentraciones de IL-2 con o sin IL-15, lo cual podría indicar que la expresión de CD27 es principalmente dependiente de la señalización del TCR promovido por las células dendríticas, como ha sido sugerido previamente (160).

Una estimulación *in vitro* prolongada del TCR (>3 semanas) en las células Tregs CD4⁺CD25^{hi} (147) o CD25^{hi}CD127⁻ (161) puede resultar en una pérdida significativa de la expresión de FOXP3. Las células Tregs-AE CD27^{hi} aisladas y expandidas *ex vivo* durante tres semanas con anti-CD3/CD28, rapamicina, TGF- β e IL-2 en presencia o ausencia de IL-15 retuvieron la expresión de CD25 y FOXP3 (>94%), coincidiendo con los resultados previos (143) donde mostraron que la estimulación de Tregs CD27^{hi} mantienen altos niveles de FOXP3 debido a un incremento en la desmetilación del TSDR-*Foxp3*. El protocolo de expansión policlonal de las células Tregs-AE utilizado en nuestro laboratorio incluye el uso de mediadores que promueven el mantenimiento de FOXP3 (138). La rapamicina ha mostrado inhibir de manera preferencial la proliferación de células Tconv y al mismo tiempo favorecer el incremento de células Tregs las cuales son menos dependientes de mTOR para satisfacer sus necesidades energéticas y, al mismo tiempo, la rapamicina incrementa la expresión de FOXP3 (126). Por otro lado, la adición de TGF- β tendría dos funciones: primero, ha sido relacionado positivamente con la regulación transcripcional y epigenética del gen de *Foxp3* a través de la inhibición de modificadores de la cromatina (DNMT1 y Uhrf1) (149); segundo, a nivel postraduccional el TGF- β promueve la fosforilación y acetilación en múltiples residuos de aminoácidos de FOXP3, reduciendo así su ubiquitinación y degradación proteosomal (150).

Durante la expansión policlonal de las células Tregs-AE CD27^{hi}, se observó que la condición IL-2 (250 U) + IL-15 (10 ng/mL) indujo una mayor proliferación comparado con solo IL-2 (250 U), con un incremento relativo de 251 y 570, respectivamente, hasta el día 21. Las células Tregs expresan las cadenas α , β y γ común de los receptores de IL-2 e IL-15, y una vez que las células Tregs son activadas a través del TCR, incrementan la expresión de los receptores de ambas citocinas (164). En este contexto, tanto la IL-2 como la IL-15 favorece la supervivencia de las células Treg por medio de la inducción de la proteína anti-apoptótica bcl-2, y además, optimiza la función supresora de las células

Tregs a través de la activación de STAT5, la cual promueve la expresión de FOXP3 (165,166). Además, se ha reportado que la IL-2 junto a la IL-15 tienen un efecto sinérgico sobre la proliferación de células Tregs policlonales (167). En conjunto, lo anterior podría explicar la mayor proliferación y supervivencia de células Tregs-AE CD27^{hi} estimuladas policlonalmente con IL-2 + IL-15 obtenida en este trabajo. De manera importante, la proliferación de las células Tregs-AE CD27^{hi} expandidas policlonalmente con IL-2 + IL-15 durante tres semanas es mayor comparado con las células Tregs-AE CD25^{hi} expandidas con solo IL-2 reportadas en el previo trabajo de nuestro grupo de trabajo (138), con incrementos relativos de 574 veces vs 319 veces, respectivamente.

Las células Tregs-AE CD27^{hi} expandidas a largo plazo presentaron altos niveles de marcadores supresores como CD39, Helios, CTLA-4 y LAG-3. La expresión de CD39 en células Tregs es necesaria para la formación de adenosina extracelular, la cual suprime las funciones efectoras de las células Tconv y de las CD8 a través del receptor de adenosina A2aR (168). En el contexto del trasplante, el incremento de células Tregs de memoria CD39⁺ ha sido reportado en pacientes con aloinjertos renales que desarrollaron tolerancia clínico operacional (124,169). En este trabajo, se presenta un mayor porcentaje de la expresión de CD39 (>90%) en las Tregs-AE CD27^{hi} (IL-2 + IL-15) al concluir los ciclos de expansión en comparación con los resultados de Arroyo y colaboradores (aproximadamente 50%) (143). Si bien la expresión de CD39 en células Tregs puede ser regulada por el TCR y la IL-2 (170), esta expresión podría estar potenciada por la presencia del TGF- β empleado en los cultivos, el cual promueve la proliferación de células Tregs CD39⁺ por medio de la vía TGF- β /SOX4 (171,172). Y aunque no se ha reportado que la IL-15 induzca directamente la transcripción o regulación postraduccional de CD39 en las células Tregs, reportes previos han informado la participación de la IL-15 en la proliferación y homeostasis de células NKs y T de memoria CD39⁺ *in vivo* (173)(174).

Una investigación previa del laboratorio demostró que la disminución de la expresión de Helios en las células Tregs-AE CD25^{hi} expandidas policlonalmente con IL-2 después de varias semanas, se correlacionó con una disminución significativa de la desmetilación de citosinas en el TSDR de *Foxp3* (138), esta última, es una marca epigenética necesaria para mantener la capacidad supresora de las células Tregs *in vivo* durante respuestas inflamatorias (60,61). Interesantemente, los resultados obtenidos en esta tesis mostraron que las células Tregs-AE CD27^{hi} estimuladas con IL-2 + IL-15 mantuvieron una mayor expresión de Helios en comparación con el previo trabajo mencionado (69% vs 38%) donde se expandieron las células Tregs-AE CD25^{hi} con solo IL-2 (138). Estos resultados

concuerdan con los datos obtenidos por Arroyo y colaboradores (143), donde demostraron que las células Tregs CD27⁺ estimuladas policlonalmente durante dos semanas mantienen la expresión de Helios y esto se correlaciona con una mayor desmetilación del TSDR-*Foxp3*, comparada con su contraparte la subpoblación de células Tregs CD27⁻. Aunque la señalización a través de los receptores de IL-15 e IL-2 no han sido relacionados con la inducción de la expresión de Helios, se ha reportado que IL-15 es importante para la homeostasis y función *in vivo* de las células Tregs FOXP3⁺ Helios⁺ (81). Por otra parte, el aumento de las células Tregs Helios⁺ se ha correlacionado con un buen pronóstico de aceptación del aloinjerto en humanos (175,176).

CTLA-4 es un receptor inhibitorio y su papel en las células Tregs es suprimir la activación de las células Tconv a través de la modulación de las funciones de las CDs (177). En células Tregs, la expresión de CTLA-4 es principalmente modulada por FOXP3, el cual se une al gen *Ctla4* regulando positivamente su transcripción (178). Además, las células Tregs deficientes de CTLA-4 no pueden suprimir la proliferación de linfocitos Tconv alo-reactivas, incluso en proporciones altas de Treg:Tresp (86). La expresión de CTLA-4 intracelular en células Tregs-AE reportada en la presente tesis fue muy similar a los resultados de Hans y colaboradores (136), donde reportaron un mayor porcentaje de CTLA-4⁺ (>88%) en células Tregs-AE CD27^{hi} comparado con Tregs CD27⁻ (<60%) después de una expansión con IL-2 más IL-15. Además, no encontramos diferencia en los niveles de CTLA-4 entre las células Tregs-AE CD27^{hi} expandidas con IL-2 o con IL-2 + IL-15 (Fig. 10 E), lo que concuerda con el hecho de que estimulación con IL-15 no tuvo un efecto en la expresión de FOXP3 dentro de las células Tregs-AE CD27^{hi}.

En este trabajo, se ha evaluado por primera vez la expresión de LAG-3 en células Tregs-AE CD27^{hi}, un correceptor inhibitorio que evita la activación de las células T al unirse al MHC-II expresado en CDs con mayor afinidad que CD4, y además adquiere moléculas del MHC-II de las CPAs por un proceso llamado trogocitocis (179,180). Los resultados mostraron que las células Tregs CD27^{hi} expandidas en presencia o ausencia de IL-15 tienen una baja expresión de LAG-3, lo cual podría deberse a que se realizó la evaluación de este marcador después de tres días de reposo, donde se retiró el estímulo con anti-CD3/CD28 y se mantuvieron las células en medio cultivo con solo IL-2. En este contexto, se ha demostrado que la expresión de LAG-3 en los linfocitos T depende de la señalización a través del TCR (88), y que aproximadamente la mitad de todas las moléculas de LAG-3 se localizan inmediatamente en los endosomas tardíos después de retirar la estimulación (181).

El perfil de expresión del receptor de quimiocinas en células Tregs FOXP3⁺ es necesario para la migración dirigida a tejidos y potenciar la supresión de las poblaciones celulares alorreactivas involucradas en el rechazo favoreciendo la tolerancia del aloinjerto (5,108). Estudios previos de células Tregs CD27^{hi} únicamente habían evaluado la expresión de CCR6 (143) y CCR7 (136). En este trabajo se demostró que las células Tregs-AE CD27^{hi} expresan receptores de quimiocinas relevantes para su migración hacia aloinjertos incluyendo CCR2, CXCR3 y CCR4 (111). CCR2 es importante para la expresión óptima de CD25 en células Tregs en condiciones homeostáticas y para su localización tanto en órganos linfoides como en tejidos periféricos inflamados, además las células Tregs deficientes de CCR2 tienen una menor capacidad supresora *in vitro* (116). Modelos en animales han demostrado que CXCR3 es crucial para la migración de las células Tregs hacia los sitios de inflamación (113), y de manera importante, las células Tregs CXCR3⁺ son esenciales para el establecimiento de la tolerancia hacia aloinjertos renales (121). La expresión de CCR4 en las células Tregs permite que migren hacia sitios donde se establecen las CPAs y las células T activadas, lo cual favorece la inmunosupresión mediada por Tregs (117). Además, la tolerancia inducida por células Tregs en el aloinjerto de trasplante cardíaco depende de la expresión de CCR4 (182).

Las células Tregs Foxp3⁺ que expresan CCR7 se alojan en los nódulos linfáticos, donde se expanden por medio de la estimulación antigénica y suprimen las respuestas de las células Tconv en los órganos linfoides secundarios (119). Nuestros resultados mostraron que las células Tregs-AE CD27^{hi} expandidas con IL-2 + IL-15 muestran una tendencia a presentar una mayor expresión de CCR7 en comparación con las expandidas con sólo IL-2. Aunque el grupo de Hans y colaboradores encontraron una muy baja expresión de CCR7 en células Tregs-AE CD27⁺, las diferencias con nuestros resultados podrían deberse al segundo tipo de estímulo (CMNs vs anti-CD3/-CD28) y la adición de rapamicina, la cual favorecería la translocación al núcleo de los factores de transcripción FOXOs, los cuales regulan a la alza la expresión de CCR7 (183).

Una elevada expresión de marcadores inmunorreguladores (FOXP3, Helios, CD39, CTLA-4) en las células Tregs-AE CD27^{hi} expandidas se correlacionó con una gran función supresora *in vitro* de células Tconv policlonales (>90%), y está en concordancia con el hecho de que la rapamicina incrementa la capacidad reguladora de las células Tregs policlonales (126). De manera importante, demostramos que las células Tregs-AE CD27^{hi} suprimieron >60% la proliferación de células TCD4⁺ y T CD8⁺ de manera antígeno-específica hasta proporciones 1:27 de Tregs:Tconv. Aunque estos resultados parecerían ser menores a los obtenidos por Hans y colaboradores (136) donde reportaron

supresiones >80% en proporciones 1:50 en ensayos de supresión aloantígeno-específicos, en su estudio utilizaron a las CMNs tanto como CPAs como células respondedoras; además, los autores evaluaron la proliferación mediante la incorporación de timidina tritiada (^3H) en las últimas 8 horas de cultivo, lo cual podría llevar a una sobreestimación de los resultados (184). En cambio, nosotros empleamos CDs-mo como CPAs y a linfocitos T purificados marcados con CFSE como células respondedoras para evaluar la proliferación a los cinco días de cultivo.

Finalmente, los cultivos de células Tregs-AE CD27^{hi} expandidas policlonalmente contenían una pureza mayor al 94% de células T CD25⁺FOXP3⁺, lo cual es relevante en el contexto de la inmunoterapia para evitar efectos adversos relacionados a la contaminación por células no reguladoras potencialmente inflamatorias. Estos resultados se podrían deberse a: primero, el aislamiento de células Tregs mediante FACS, como se discutió anteriormente; segundo, el uso de ácido retinoico (157), TGF- β (138) y la rapamicina (126) los cuales favorecen la expresión de FOXP3 y, como se mencionó anteriormente, la rapamicina inhibe el crecimiento de células T no reguladoras. Aunque no se puede excluir la posibilidad de que las células Tregs-AE se reprogramen a células T inflamatorias como linfocitos Th17 después de la transferencia *in vivo* (4), se ha publicado que la señalización a través de CD27 suprime la expresión de genes relacionados a la diferenciación Th17 en células Tregs (185). Además, la administración de rapamicina *in vivo* evitaría una reprogramación a células T no reguladoras, y por esta razón, ya ha sido utilizado en ensayos clínicos con células Tregs expandidas (186). Asimismo, es necesario realizar un análisis de modificaciones epigenéticas (metilación del ADN, modificación de histonas) en el gen de *Foxp3* y otros genes relevantes para corroborar que el fenotipo de las células Tregs-AE CD27^{hi} expandidas con IL-2 + IL-15 (alta expresión de FOXP3, Helios, CD39, CTLA-4, y capacidad supresora) se correlaciona con marcas epigenéticas esenciales para mantener la identidad de un linaje Treg *in vivo*.

11. Conclusiones

1. Las CDs-mo alogénicas e IL-2 inducen la proliferación de células Tregs CD27^{hi} en presencia o ausencia de IL-15, las cuales tienen una mayor expresión de FOXP3 y Helios comparada con las células Treg CD27^{lo}.
2. La adición de IL-2 (250 U/mL) e IL-15 (10 ng/mL) incrementa la proliferación y sobrevivencia de células Tregs-AE CD27^{hi} después de tres semanas de expansión policlonal *ex vivo*.
3. Las células Tregs-AE CD27^{hi} expandidas policlonalmente con IL-2 (250 U/mL) e IL-15 (10 ng/mL) exhiben una alta expresión de marcadores inmunorreguladores incluyendo FOXP3, Helios, CTLA-4, CD39 y CD25, así como receptores de quimiocinas CXCR3, CCR2 y CCR4.
4. Las células Tregs-AE CD27^{hi} expandidas a largo plazo tienen la capacidad de suprimir la proliferación de células Tconv CD4⁺ y CD8⁺ de manera aloantígeno específica.
5. Las células Tregs-AE CD27^{hi} expandidas tienen una pureza de células CD25⁺FOXP3⁺ mayor del 94%.

12. Perspectivas

Tomando en cuenta los resultados, discusión y conclusiones presentados en esta tesis, se propone realizar los siguientes ensayos para terminar de caracterizar las Tregs-AE CD27^{hi} expandidas con IL-2 ± IL-15:

1. Realizar más ensayos para fortalecer los análisis estadísticos.
2. Evaluar el porcentaje de desmetilación de citosinas de ADN y otras modificaciones de histonas (H3K27Ac y H3K4me1) en los genes de *Foxp3*, *Cd25*, *Ctla-4* y *Ikzf2* de las células Tregs-AE CD27^{hi} expandidas en presencia de IL-2 (250 U/mL) e IL-15 (10 ng/mL).
3. Realizar ensayos de quimiotaxis *in vitro* para evaluar la funcionalidad de los receptores de quimiocinas CXCR3, CCR2, CCR4 y CCR7 expresados en las células Tregs-AE CD27^{hi} expandidas en presencia de IL-15 e IL-2.
4. Analizar el efecto de un microambiente inflamatorio (estímulo en presencia de citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6, entre otras) sobre la expresión de marcadores inmunorreguladores (FOXP3, CD25, CTLA-4, CD39, CD73, LAG-3, Helios), los receptores de quimiocinas (CXCR3, CCR2, CCR4 y CCR7), la migración *in vitro* y la función supresora de las células Tregs-AE CD27^{hi} expandidas.

13. Bibliografía

1. Martín Moreno PL, Errasti P. Trasplante renal. *An Sist Sanit Navar*. 2006;29(SUPPL. 2):79–92.
2. CENATRA. REPORTE ANUAL 2020 DE DONACIÓN Y TRASPLANTES EN MÉXICO. 2020;
3. CENATRA. Estado Actual de Receptores, Donación y Trasplantes en México 1er Trimestre 2021. 2021;
4. Romano M, Fanelli G, Albany CJ, Giganti G, Lombardi G. Past, present, and future of regulatory T cell therapy in transplantation and autoimmunity. *Front Immunol*. 2019;10(JAN).
5. Moreau A, Varey E, Anegón I, Cuturi MC. Effector mechanisms of rejection. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(11):1–33.
6. Marcén R, Orofino L, Orte L. Necrosis tubular aguda en el inmediato postrasplante renal. 1992. p. 210–5.
7. Marypaz GR, Claudio Francisco RM, Christian BM, María Valeria FB, Luis Humberto RO, Paul Humberto VC, et al. Análisis de factores predisponentes para doble rechazo de aloinjerto renal de donante vivo y cadavérico en paciente con glomerulonefritis de cambios mínimos. *Rev Mex Traspl*. 2020;9(S3):252–76.
8. Vázquez Martul E. Patología crónica del injerto renal. *Nefrología*. 2008;28(4):373–80.
9. Monserrat Sanz J, Martín M, Reyes E, Prieto Martín A. Células presentadoras de antígeno. *Med [Internet]*. 2013;11(28):1720–7. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-5412\(13\)70548-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-5412(13)70548-1)
10. Zhuang Q, Lakkis FG. Dendritic Cells and Innate Immunity in Kidney Transplantation. *Department Heal Hum Serv USA [Internet]*. 2015;87(4):712–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4382394/>
11. Nelson PJ, Rees AJ, Griffin MD, Hughes J, Kurts C, Duffield J. The renal mononuclear phagocytic system. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(2):194–203.
12. Béland S, Désy O, Vallin P, Basoni C, De Serres SA. Innate immunity in solid organ transplantation: An update and therapeutic opportunities. *Expert Rev Clin Immunol*. 2015;11(3):377–89.
13. Ingulli E. Mechanism of cellular rejection in transplantation. *Pediatr Nephrol*. 2010;25(1):61–74.
14. HLA. Alleles. HLA Alleles Numbers. 2021;(March):13–4.
15. Epstein MM, Di Rosa F, Jankovic D, Sher A, Matzinger P. Successful T cell priming in B cell-deficient mice. *J Exp Med*. 1995;182(4):915–22.
16. Brändle D, Joergensen J, Gerhard Z, Bürki K, Hof RP. CONTRIBUTION_OF_DONOR_SPECIFIC_ANTIBODIES_TO_ACUTE. 1998. p. 28.
17. Exner BG, Que X, Mueller YM, Domenick MA, Neipp M, Ildstad ST. $\alpha\beta$ TCR+ T cells play a nonredundant role in the rejection of heart allografts in mice. *Surgery*. 1999;126(2):121–6.
18. Mannon RB, Griffiths R, Ruiz P, Platt JL, Coffman TM. Absence of donor MHC antigen expression ameliorates chronic kidney allograft rejection. *Kidney Int*. 2002;62(1):290–300.
19. Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, Ochoa FS, James MJ, Marelli-Berg FM, et al. A Novel Pathway of Alloantigen Presentation by Dendritic Cells. *J Immunol*. 2004;173(8):4828–37.
20. Smyth LA, Herrera OB, Golshayan D, Lombardi G, Lechler RI. A novel pathway of antigen presentation by dendritic and endothelial cells: Implications for allorecognition and infectious diseases. *Transplantation*. 2006;82(SUPPL. 1):15–8.
21. Gaughan A, Wang J, Pelletier RP, Nadasdy T, Brodsky S, Roy S, et al. Key role for CD4 T cells during mixed antibody mediated rejection of renal allografts. *Bone [Internet]*. 2014;14(2):284–94. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
22. Liu Z, Fan H, Jiang S. CD4+ T-cell subsets in transplantation. *Immunol Rev*. 2013;252(1):183–91.
23. Yuan X, Ansari MJ, D’Addio F, Paez-Cortez J, Schmitt I, Donnarumma M, et al. Targeting Tim-1 to overcome resistance to transplantation tolerance mediated by CD8 T17 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(26):10734–9.
24. Jiang S, Herrera O, Lechler RI. New spectrum of allorecognition pathways: Implications for graft rejection and transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol*. 2004;16(5):550–7.
25. Laan M, Cui ZH, Hoshino H, Lötval J, Sjöstrand M, Gruenert DC, et al. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol [Internet]*. 1999;162(4):2347–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9973514>
26. Zelenika D, Adams E, Mellor A, Simpson E, Chandler P, Stockinger B, et al. Rejection of H-Y disparate skin grafts by monospecific CD4+ Th1 and Th2 cells: No requirement for CD8+ T cells or B cells. *J Immunol*. 1998;161(4):1868–18674.
27. Barbara JAJ, Turvey SE, Kingsley CI, Spriewald BM, Hara M, Witzke O, et al. Islet allograft rejection can be mediated by CD4+, alloantigen experienced, direct pathway T cells of Th1 and Th2 cytokine

- phenotype1. *Transplantation*. 2000;70(11 SUPPL.):1641–9.
28. Lu LF, Lind EF, Gondek DC, Bennett KA, Gleeson MW, Pino-Lagos K, et al. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature*. 2006;442(7106):997–1002.
 29. Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25 + CD4 + Regulatory T Cells Prevent Graft Rejection: CTLA-4- and IL-10-Dependent Immunoregulation of Alloresponses . *J Immunol*. 2002;168(3):1080–6.
 30. Shevach EM. Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression. *Immunity* [Internet]. 2009;30(5):636–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2009.04.010>
 31. Hill P, Cross NB, Barnett ANR, Palmer SC, Webster AC. Polyclonal and monoclonal antibodies for induction therapy in kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;2017(1).
 32. Giessing M, Fuller TF, Tuellmann M, Slowinski T, Budde K, Liefeldt L. Steroid- and calcineurin inhibitor free immunosuppression in kidney transplantation: State of the art and future developments. *World J Urol*. 2007;25(3):325–32.
 33. Ticona-garrón AB, Álvarez-rangel LE, Martínez-romo ME, Arancibia-bolaños FJ. Supervivencia del paciente e injerto renal al año de trasplante de donante fallecido; comparación con resultados de donante vivo. *Rev Mex Urol*. 2010;70(6):347–53.
 34. Johnston O, O’Kelly P, Donohue J, Walshe JJ, Little DM, Hickey D, et al. Favorable graft survival in renal transplant recipients with polycystic kidney disease. *Ren Fail*. 2005;27(3):309–14.
 35. Lentine KL, Costa SP, Weir MR, Robb JF, Fleisher LA, Kasiske BL, et al. Cardiac disease evaluation and management among kidney and liver transplantation candidates: A scientific statement from the American heart association and the American college of cardiology foundation. *Circulation*. 2012;126(5):617–63.
 36. Nashan B, Moore R, Amlot P, Schmidt A-G, Abeywickrama K, Soulillou J-P. Randomised trial of basiliximab versus placebo for control of acute cellular rejection in renal allograft recipients. *Transplant Proc* [Internet]. 1997;350(9086):1193–8. Available from: [sci-hub.tw/10.1016/S0140-6736\(97\)09278-7](http://sci-hub.tw/10.1016/S0140-6736(97)09278-7)
 37. Avasarala J. DRESS Syndrome and Daclizumab Failure—Were Potentially Dangerous Signs Missed in Clinical Trials? *Drug Target Insights*. 2018;12:10–1.
 38. Lipshutz GS, Flechner SM, Govani M V., Vincenti F. BK nephropathy in kidney transplant recipients treated with a calcineurin inhibitor-free immunosuppression regimen. *Am J Transplant*. 2004;4(12):2132–4.
 39. McTaggart RA, Gottlieb D, Brooks J, Bacchetti P, Roberts JP, Tomlanovich S, et al. Sirolimus prolongs recovery from delayed graft function after cadaveric renal transplantation. *Am J Transplant*. 2003;3(4):416–23.
 40. Giessing M, Budde K. Sirolimus and lymphocele formation after kidney transplantation: An immunosuppressive medication as co-factor for a surgical problem? [4]. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18(2):448–9.
 41. Pascual J. The use of everolimus in renal-transplant patients. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2009;2:9–21.
 42. Kaufman DB, Shapiro R, Lucey MR, Cherikh WS, Bustami RT, Dyke DB. Immunosuppression: Practice and trends. *Am J Transplant*. 2004;4(SUPPL. 9):38–53.
 43. Coghill AE, Johnson LG, Berg D, Resler AJ, Leca N, Madeleine MM. Immunosuppressive Medications and Squamous Cell Skin Carcinoma: Nested Case-Control Study Within the Skin Cancer after Organ Transplant (SCOT) Cohort. *Am J Transplant*. 2016;16(2):565–73.
 44. Jiyad Z, Olsen CM, Burke MT, Isbel NM, Green AC. Azathioprine and Risk of Skin Cancer in Organ Transplant Recipients: Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Transplant*. 2016;16(12):3490–503.
 45. Granger DK. Enteric-coated mycophenolate sodium: Results of two pivotal global multicenter trials. *Transplant Proc*. 2001;33(7–8):3241–4.
 46. Sinclair NR. Low-dose steroid therapy in cyclosporine-treated renal transplant recipients with well-functioning grafts. *Cmaj*. 1992;147(5):645–57.
 47. Hu M, Wang YM, Wang Y, Zhang GY, Zheng G, Yi S, et al. Regulatory T cells in kidney disease and transplantation. *Kidney Int* [Internet]. 2016;90(3):502–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.kint.2016.03.022>
 48. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2003;198(3):986–92.
 49. Hori S, Nomura T, S S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3 Author (s): Shohei Hori , Takashi Nomura and Shimon Sakaguchi Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/3833558>. 2003;299(5609):1057–61.

50. Shevryev D, Tereshchenko V. Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis. *Front Immunol.* 2020;10(January):1–13.
51. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell.* 2008;133(5):775–87.
52. Safinia N, Scotta C, Vaikunthanathan T, Lechler RI, Lombardi G. Regulatory T cells: Serious contenders in the promise for immunological tolerance in transplantation. *Front Immunol.* 2015;6(AUG):1–16.
53. Kanamori M, Nakatsukasa H, Okada M, Lu Q, Yoshimura A. Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends Immunol [Internet].* 2016;37(11):803–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2016.08.012>
54. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA, et al. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol.* 2001;2(4):301–6.
55. Goldstein JD, Pérol L, Zaragoza B, Baeyens A, Marodon G, Piaggio E. Role of cytokines in thymus-versus peripherally derived-regulatory T cell differentiation and function. *Front Immunol.* 2013;4(JUN):1–10.
56. Vella AT, Dow S, Potter TA, Kappler J, Marrack P. Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(7):3810–5.
57. Kitagawa Y, Ohkura N, Kidani Y, Vandenberg A, Hirota K, Kawakami R, et al. Guidance of regulatory T cell development by Satb1-dependent super-enhancer establishment. *Nat Immunol [Internet].* 2016;18(2):173–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.3646>
58. Josefowicz SZ, Niec RE, Kim HY, Treuting P, Chinen T, Zheng Y, et al. Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal T H 2 inflammation. *Nature.* 2012;482(7385):395–9.
59. Huehn J, Beyer M. Epigenetic and transcriptional control of Foxp3+ regulatory T cells. *Semin Immunol [Internet].* 2015;27(1):10–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2015.02.002>
60. Feng Y, Arvey A, Chinen T, Van Der Veecken J, Gasteiger G, Rudensky AY. Control of the inheritance of regulatory T cell identity by a cis element in the foxp3 locus. *Cell [Internet].* 2014;158(4):749–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.031>
61. Li X, Liang Y, Leblanc M, Benner C, Zheng Y. Function of a foxp3 cis-element in protecting regulatory T cell identity. *Cell [Internet].* 2014;158(4):734–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.030>
62. Lee W, Lee GR. Transcriptional regulation and development of regulatory T cells. *Exp Mol Med [Internet].* 2018;50(3):e456–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/emmm.2017.313>
63. Feng Y, Van Der Veecken J, Shugay M, Putintseva E V., Osmanbeyoglu HU, Dikiy S, et al. A mechanism for expansion of regulatory T-cell repertoire and its role in self-tolerance. *Nature.* 2015;528(7580):132–6.
64. Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, Peng XP, Forbush K, Rudensky AY. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature [Internet].* 2010;463(7282):808–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature08750>
65. Perera LP. Interleukin 15: Its role in inflammation and immunity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2000;48(6):457–64.
66. Overwijk WW, Schluns KS. Functions of γ C cytokines in immune homeostasis: Current and potential clinical applications. *Clin Immunol.* 2009;132(2):153–65.
67. Lodolce JP, Boone DL, Chai S, Swain RE, Dassopoulos T, Trettin S, et al. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity.* 1998;9(5):669–76.
68. Marçais A, Viel S, Grau M, Henry T, Marvel J, Walzer T. Regulation of mouse NK cell development and function by cytokines. *Front Immunol.* 2013;4(DEC):1–14.
69. Cui G, Hara T, Simmons S, Wagatsuma K, Abe A, Miyachi H, et al. Characterization of the IL-15 niche in primary and secondary lymphoid organs in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(5):1915–20.
70. Gordy LE, Bezbradica JS, Flyak AI, Spencer CT, Dunkle A, Sun J, et al. IL-15 regulates homeostasis and terminal maturation of NKT cells. *J Immunol [Internet].* 2011;187(12):6335–45. Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf%0Afile:///C:/Users/ASUS/Desktop/Rujukan PhD/Dev of drug R cell line/nihms579608.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf%0Afile:///C:/Users/ASUS/Desktop/Rujukan%20PhD/Dev%20of%20drug%20R%20cell%20line/nihms579608.pdf)
71. Di Sabatino A, Calarota SA, Vidali F, MacDonald TT, Corazza GR. Role of IL-15 in immune-mediated and infectious diseases. *Cytokine Growth Factor Rev [Internet].* 2011;22(1):19–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.09.003>
72. Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: Biology and relevance to human disease. *Blood.* 2001;97(1):14–32.
73. Perera PY, Lichy JH, Waldmann TA, Perera LP. The role of interleukin-15 in inflammation and immune

- responses to infection: Implications for its therapeutic use. *Microbes Infect.* 2012;14(3):247–61.
74. Budagian V, Bulanova E, Paus R, Bulfone-Paus S. IL-15/IL-15 receptor biology: A guided tour through an expanding universe. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006;17(4):259–80.
 75. Burchill MA, Yang J, Vang KB, Moon JJ, Chu HH, Lio CJ, et al. Linked T Cell Receptor and Cytokine Signaling Govern the Development of the Regulatory T cell Repertoire. 2008;28(1):112–21.
 76. Lio C-W, Hsieh C-S. A 2 step process for thymic Treg development. *Immunity* [Internet]. 2008;28(1):100–11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2248212/pdf/nihms38563.pdf>
 77. Burchill MA, Yang J, Vogtenhuber C, Blazar BR, Farrar MA. IL-2 Receptor β -Dependent STAT5 Activation Is Required for the Development of Foxp3 + Regulatory T Cells . *J Immunol.* 2007;178(1):280–90.
 78. Cheng G, Yu A, Dee MJ, Malek TR. IL-2R signaling is essential for functional maturation of T regulatory cells during thymic development. *J Immunol* [Internet]. 2013;190(4):1567–75. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
 79. Toomer KH, Malek TR. Cytokine signaling in the development and homeostasis of regulatory T cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10(3):1–16.
 80. Clark RA, Kupper TS. IL-15 and dermal fibroblasts induce proliferation of natural regulatory T cells isolated from human skin. *Blood.* 2007;109(1):194–202.
 81. Tosiek MJ, Fiette L, El Daker S, Eberl G, Freitas AA. IL-15-dependent balance between Foxp3 and ROR γ t expression impacts inflammatory bowel disease. *Nat Commun.* 2016;7:1–11.
 82. Kovanen PE, Leonard WJ. Cytokines and immunodeficiency diseases: Critical roles of the γ c-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunol Rev.* 2004;202:67–83.
 83. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4+CD25+ T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med.* 2001;193(11):1303–10.
 84. Cederbom L, Hall H, Ivars F. Stimulatory Molecules on Antigen-Presenting Cells. *Cell.* 2000;1538–43.
 85. Onishi Y, Fehervari Z, Yamaguchi T, Sakaguchi S. Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(29):10113–8.
 86. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi S. CTLA-4 Control over Foxp3+ Regulatory T cell function. *Science* (80-). 2008;322(5899):268–71.
 87. Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L, et al. Regulatory T Cells Inhibit Dendritic Cells by Lymphocyte Activation Gene-3 Engagement of MHC Class II. *J Immunol.* 2008;180(9):5916–26.
 88. Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity.* 2004;21(4):503–13.
 89. Workman CJ, Vignali DAA. Negative Regulation of T Cell Homeostasis by Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223). *J Immunol.* 2005;174(2):688–95.
 90. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 2007;204(6):1257–65.
 91. Fletcher JM, Loneragan R, Costelloe L, Kinsella K, Moran B, O’Farrelly C, et al. CD39 + Foxp3 + Regulatory T Cells Suppress Pathogenic Th17 Cells and Are Impaired in Multiple Sclerosis . *J Immunol.* 2009;183(11):7602–10.
 92. Gu J, Ni X, Pan X, Lu H, Lu Y, Zhao J, et al. Human CD39hi regulatory T cells present stronger stability and function under inflammatory conditions. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2016;14(6):521–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cmi.2016.30>
 93. Álvarez-Sánchez N, Cruz-Chamorro I, Díaz-Sánchez M, Lardone PJ, Guerrero JM, Carrillo-Vico A. Peripheral CD39-expressing T regulatory cells are increased and associated with relapsing-remitting multiple sclerosis in relapsing patients. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–8.
 94. Beavis PA, Stagg J, Darcy PK, Smyth MJ. CD73: A potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol* [Internet]. 2012;33(5):231–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2012.02.009>
 95. Allard B, Longhi MS, Robson SC, John Stagg. The ectonucleotidases CD39 and CD73: novel checkpoint inhibitor. *Physiol Behav.* 2017;276(1):121–44.
 96. Schuler PJ, Saze Z, Hong CS, Muller L, Gillespie DG, Cheng D, et al. Human CD4+CD39+ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73+ exosomes or CD73+ cells. *Clin Exp Immunol.* 2014;177(2):531–43.
 97. Fassbender M, Gerlitzki B, Ullrich N, Lupp C, Klein M, Radsak MP, et al. Cyclic adenosine monophosphate and IL-10 coordinately contribute to nTreg cell-mediated suppression of dendritic cell

- activation. *Cell Immunol* [Internet]. 2010;265(2):91–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2010.07.007>
98. Willems F, Marchant A, Delville J -P, Gérard C, Delvaux A, Velu T, et al. Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur J Immunol*. 1994;24(4):1007–9.
 99. Schuetze N, Schoeneberger S, Mueller U, Freudenberg MA, Alber G, Straubinger RK. IL-12 family members: Differential kinetics of their TLR4-mediated induction by *Salmonella* Enteritidis and the impact of IL-10 in bone marrow-derived macrophages. *Int Immunol*. 2005;17(5):649–59.
 100. Groux H, Bigler M, De Vries JE, Roncarolo MG. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med*. 1996;184(1):19–29.
 101. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4+CD25+ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor β . *J Exp Med*. 2001;194(5):629–44.
 102. Gorelik L, Constant S, Flavell RA. Mechanism of transforming growth factor β -induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J Exp Med*. 2002;195(11):1499–505.
 103. Gorelik L, Fields PE, Flavell RA. Cutting Edge: TGF- β Inhibits Th Type 2 Development Through Inhibition of GATA-3 Expression. *J Immunol*. 2000;165(9):4773–7.
 104. Oh SA, Li MO. TGF- β : Guardian of T Cell Function. *J Immunol*. 2013;191(8):3973–9.
 105. DiPaolo RJ, Brinster C, Davidson TS, Andersson J, Glass D, Shevach EM. Autoantigen-Specific TGF β -Induced Foxp3 + Regulatory T Cells Prevent Autoimmunity by Inhibiting Dendritic Cells from Activating Autoreactive T Cells. *J Immunol*. 2007;179(7):4685–93.
 106. Chen WJ, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *J Exp Med*. 2003;198(12):1875–86.
 107. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 2007;450(7169):566–9.
 108. Siachoque H, Satisfesteban N, Iglesias-Gamarra A. Linfocitos T reguladores: Subpoblaciones, mecanismo de acción e importancia en el control de la autoinmunidad. *Rev Colomb Reumatol*. 2011;18(3):203–20.
 109. Olson BM, Sullivan JA, Burlingham WJ. Interleukin 35: A Key Mediator of Suppression and the Propagation of Infectious Tolerance. *Front Immunol*. 2013;4(October):1–12.
 110. Schmidt A, Oberle N, Krammer PH. Molecular mechanisms of treg-mediated cell suppression. *Front Immunol*. 2012;3(MAR):1–20.
 111. Lamarche C, Levings MK. Guiding regulatory T cells to the allograft. *Curr Opin Organ Transplant*. 2018;23(1):106–13.
 112. Rabant M, Amrouche L, Morin L, Bonifay R, Lebreton X, Aouni L, et al. Early Low Urinary CXCL9 and CXCL10 Might Predict Immunological Quiescence in Clinically and Histologically Stable Kidney Recipients. *Am J Transplant*. 2016;16(6):1868–81.
 113. Paust HJ, Riedel JH, Krebs CF, Turner JE, Brix SR, Krohn S, et al. CXCR3+ regulatory T cells control TH1 responses in crescentic GN. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(7):1933–42.
 114. Raza A, Firasat S, Khaliq S, Aziz T, Mubarak M, Naqvi SAA, et al. The association of urinary interferon-gamma inducible protein-10 (IP10/CXCL10) levels with kidney allograft rejection. *Inflamm Res*. 2017;66(5):425–32.
 115. Raza A, Firasat S, Khaliq S, Khan AR, Mahmood S, Aziz T, et al. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1/CCL2) Levels and Its Association with Renal Allograft Rejection. *Immunol Invest* [Internet]. 2016;46(3):251–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/08820139.2016.1248559>
 116. Zhan Y, Wang N, Vasanthakumar A, Zhang Y, Chopin M, Nutt SL, et al. CCR2 enhances CD25 expression by FoxP3+ regulatory T cells and regulates their abundance independently of chemotaxis and CCR2+ myeloid cells. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2020;17(2):123–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-018-0187-8>
 117. Iellem A, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F, et al. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med*. 2001;194(6):847–53.
 118. Bhargava P, Kadin ME. Immunohistology of Hodgkin Lymphoma. *Diagnostic Immunohistochem*. 2011;137–55.
 119. Schneider MA, Meingassner JG, Lipp M, Moore HD, Rot A. CCR7 is required for the in vivo function of CD4+ CD25 + regulatory T cells. *J Exp Med*. 2007;204(4):735–45.
 120. Alessandrini A, Turka LA. FOXP3-Positive Regulatory T Cells and Kidney Allograft Tolerance. *Am J Kidney Dis*. 2017;69(5):667–74.

121. Hu M, Wang C, Zhang GY, Saito M, Wang YM, Fernandez MA, et al. Infiltrating Foxp3+ regulatory T cells from spontaneously tolerant kidney allografts demonstrate donor-specific tolerance. *Am J Transplant*. 2013;13(11):2819–30.
122. Miyajima M, Chase CM, Alessandrini A, Farkash EA, Della Pelle P, Benichou G, et al. Early acceptance of renal allografts in mice is dependent on Foxp3 + cells. *Am J Pathol* [Internet]. 2011;178(4):1635–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.12.024>
123. Bestard O, Cruzado JM, Rama I, Torras J, Gomà M, Serón D, et al. Presence of FoxP3+ regulatory T cells predicts outcome of subclinical rejection of renal allografts. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(10):2020–6.
124. Braza F, Dugast E, Panov I, Paul C, Vogt K, Pallier A, et al. Central role of CD45RA- Foxp3hi memory regulatory T cells in clinical kidney transplantation tolerance. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(8):1795–805.
125. Louis S, Braudeau C, Giral M, Dupont A, Moizant F, Robillard N, et al. Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation*. 2006;81(3):398–407.
126. Newton R, Priyadharshini B, Turka LA. Immunometabolism of regulatory T cells HHS Public Access. *Nat Immunol* [Internet]. 2016;17(6):618–25. Available from: <http://www.nature.com/reprints/index.html>.
127. Mahr B, Unger L, Hock K, Pilat N, Baranyi U, Schwarz C, et al. IL-2 / α -IL-2 complex treatment cannot be substituted for the adoptive transfer of regulatory T cells to promote bone marrow engraftment. *PLoS One*. 2016;11(1):1–17.
128. Hutchinson JA, Geissler EK. Now or never? the case for cell-based immunosuppression in kidney transplantation. *Kidney Int* [Internet]. 2015;87(6):1116–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2015.50>
129. M. B. Ezzelarab, Zhang H, Guo H, Lu L, Zahorchak AF, Wiseman RW, et al. Regulatory T Cell Infusion Can Enhance Memory T Cell and Alloantibody Responses in Lymphodepleted Nonhuman Primate Heart Allograft Recipients. *Am J Transplant*. 2016;16(7):1999–2015.
130. Peters JH, Hilbrands LB, Koenen HJPM, Joosten I. Ex vivo generation of human alloantigen-specific regulatory T cells from CD4posCD25high T cells for immunotherapy. *PLoS One*. 2008;3(5):1–13.
131. Putnam AL, Safinia N, Medvec A, Laszkowska M, Wray M, Mintz MA, et al. Clinical Grade Manufacturing of Human Alloantigen-Reactive Regulatory T Cells for Use in Transplantation. *Am J Transplant*. 2013;13(11):3010–20.
132. Cherai M, Hamel Y, Baillou C, Touil S, Guillot-Delost M, Charlotte F, et al. Generation of human alloantigen-specific regulatory t cells under good manufacturing practice-compliant conditions for cell therapy. *Cell Transplant*. 2015;24(12):2527–40.
133. Landwehr-Kenzel S, Issa F, Luu SH, Schmück M, Lei H, Zobel A, et al. Novel GMP-compatible protocol employing an allogeneic B cell bank for clonal expansion of allospecific natural regulatory T cells. *Am J Transplant*. 2014;14(3):594–606.
134. Veerapathran A, Pidala J, Beato F, Yu XZ, Anasetti C. Ex vivo expansion of human Tregs specific for alloantigens presented directly or indirectly. *Blood*. 2011;118(20):5671–80.
135. Litjens NHR, Boer K, Zuijderwijk JM, Klepper M, Peeters AMA, Prens EP, et al. Allogeneic Mature Human Dendritic Cells Generate Superior Alloreactive Regulatory T Cells in the Presence of IL-15. *J Immunol*. 2015;194(11):5282–93.
136. Koenen HJPM, Fasse E, Joosten I. CD27/CFSE-Based Ex Vivo Selection of Highly Suppressive Alloantigen-Specific Human Regulatory T Cells. *J Immunol*. 2005;174(12):7573–83.
137. Alzhrani A, Bottomley M, Wood K, Hester J, Issa F. Identification, selection, and expansion of non-gene modified alloantigen-reactive Tregs for clinical therapeutic use. *Cell Immunol* [Internet]. 2020;357(September):104214. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104214>
138. Cortés-Hernández A, Alvarez-Salazar EK, Arteaga-Cruz S, Rosas-Cortina K, Linares N, Alberú Gómez JM, et al. Highly Purified Alloantigen-Specific Tregs From Healthy and Chronic Kidney Disease Patients Can Be Long-Term Expanded, Maintaining a Suppressive Phenotype and Function in the Presence of Inflammatory Cytokines. *Front Immunol*. 2021;12(686530):1–17.
139. Coquet JM, Ribot JC, Bąbala N, Middendorp S, van der Horst G, Xiao Y, et al. Epithelial and dendritic cells in the thymic medulla promote cd4+foxp3+ regulatory t cell development via the cd27-cd70 pathway. *J Exp Med*. 2013;210(4):715–28.
140. Nolte MA, Van Olfen RW, Van Gisbergen KPJM, Van Lier RAW. Timing and tuning of CD27-CD70 interactions: The impact of signal strength in setting the balance between adaptive responses and immunopathology. *Immunol Rev*. 2009;229(1):216–31.
141. Van De Ven K, Borst J. Targeting the T-cell co-stimulatory CD27/CD70 pathway in cancer

- immunotherapy: Rationale and potential. *Immunotherapy*. 2015;7(6):655–67.
142. Dhainaut M, Coquerelle C, Uzureau S, Denoed J, Acolty V, Oldenhove G, et al. Thymus-derived regulatory T cells restrain pro-inflammatory Th1 responses by downregulating CD 70 on dendritic cells . *EMBO J*. 2015;34(10):1336–48.
 143. Arroyo Hornero R, Georgiadis C, Hua P, Trzuppek D, He LZ, Qasim W, et al. CD70 expression determines the therapeutic efficacy of expanded human regulatory T cells. *Commun Biol* [Internet]. 2020;3(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s42003-020-1097-8>
 144. Banham AH. Cell-surface IL-7 receptor expression facilitates the purification of FOXP3+ regulatory T cells. *Trends Immunol*. 2006;27(12):541–4.
 145. Chougnet C, Hildeman D. Helios-controller of Treg stability and function. *Transl Cancer Res*. 2016;5(Suppl 2):S338–41.
 146. Veerapathran A, Pidala J, Beato F, Yu XZ, Anasetti C. Ex vivo expansion of human Tregs specific for alloantigens presented directly or indirectly. *Blood*. 2011;118(20):5671–80.
 147. Cortés-Hernández A, Alvarez-Salazar E, Arteaga-Cruz S, Alberu-Gómez J, Soldevila G. Ex vivo expansion of regulatory T cells from long-term Belatacept-treated kidney transplant patients restores their phenotype and suppressive function but not their FOXP3 TSDR demethylation status. *Cell Immunol* [Internet]. 2020;348(January):104044. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104044>
 148. Imamichi H, Sereti I, Lane HC. IL-15 acts as a potent inducer of CD4+CD25hi cells expressing FOXP3. *Eur J Immunol*. 2008;38(6):1621–30.
 149. Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, Embers M, et al. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med*. 2000;191(5):771–80.
 150. Xia J, Liu W, Hu B, Tian Z, Yang Y. IL-15 promotes regulatory T cell function and protects against diabetes development in NK-depleted NOD mice. *Clin Immunol* [Internet]. 2010;134(2):130–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2009.09.011>
 151. Lam AJ, Uday P, Gillies JK, Levings MK. Helios is a marker, not a driver, of human Treg stability Avery. *J Apl Teknol Pangan* [Internet]. 2021;4(1):1–2. Available from: http://www.ejurnal.its.ac.id/index.php/sains_seni/article/view/10544%0Ahttps://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=tawuran+antar+pelajar&btnG=%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103237
 152. Yu N, Li X, Song W, Li D, Yu D, Zeng X, et al. CD4+CD25+CD127low/- T cells: A more specific treg population in human peripheral blood. *Inflammation*. 2012;35(6):1773–80.
 153. Chandran S, Tang Q, Sarwal M, Laszik ZG, Putnam AL, Lee K, et al. Polyclonal Regulatory T cell Therapy for Control of Inflammation in Kidney Transplants. 2017;17(11):2945–54.
 154. Trzonkowski P, Bieniaszewska M, Juścińska J, Dobyszyk A, Krzystyniak A, Marek N, 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):22–6.
 155. Mathew JM, Voss JH, McEwen ST, Konieczna I, Chakraborty A, Huang X, et al. Generation and Characterization of Alloantigen-Specific Regulatory T Cells for Clinical Transplant Tolerance. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-19621-6>
 156. Yamazaki S, Patel M, Harper A, Bonito A, Fukuyama H, Pack M, et al. Effective expansion of alloantigen-specific Foxp3+ CD25 + CD4+ regulatory T cells by dendritic cells during the mixed leukocyte reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(8):2758–63.
 157. Lu L, Lan Q, Li Z, Zhou X, Gu J, Li Q, 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).
 158. Duggleby RC, Shaw TNF, Jarvis LB, Kaur G, Hill Gaston JS. CD27 expression discriminates between regulatory and non-regulatory cells after expansion of human peripheral blood CD4+ CD25+ cells. *Immunology*. 2007;121(1):129–39.
 159. Kawakami R, Kitagawa Y, Chen KY, Arai M, Ohara D, Nakamura Y, et al. Distinct Foxp3 enhancer elements coordinate development, maintenance, and function of regulatory T cells. *Immunity* [Internet]. 2021;54(5):947-961.e8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.04.005>
 160. Tanaskovic S, Price P, French MA, Fernandez S. Impaired Upregulation of the Costimulatory Molecules, CD27 and CD28, on CD4+ T Cells from HIV Patients Receiving ART Is Associated with Poor Proliferative. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2017;33(2):121–5.
 161. Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, Huehn J, Floess S, Wieczorek G, 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):1088–97.

162. Sun X, Cui Y, Feng H, Liu H, Liu X. TGF- β signaling controls Foxp3 methylation and T reg cell differentiation by modulating Uhrf1 activity. *J Exp Med*. 2019;216(12):2819–37.
163. Li C, Ebert PJR, Li QJ. T Cell Receptor (TCR) and Transforming Growth Factor β (TGF- β) signaling converge on DNA (cytosine-5)-methyltransferase to control forkhead box protein 3 (foxp3) locus methylation and inducible regulatory T cell differentiation. *J Biol Chem*. 2013;288(26):19127–39.
164. Wuest TY, Willette-Brown J, Durum SK, Hurwitz AA. The influence of IL-2 family cytokines on activation and function of naturally occurring regulatory T cells. *J Leukoc Biol*. 2008;84(4):973–80.
165. Koenen HJPM, Fasse E, Joosten I. IL-15 and Cognate Antigen Successfully Expand De Novo-Induced Human Antigen-Specific Regulatory CD4 + T Cells That Require Antigen-Specific Activation for Suppression. *J Immunol*. 2003;171(12):6431–41.
166. Strauss L, Czystowska M, Szajnik M, Mandapathil M, Whiteside TL. Differential responses of human regulatory T cells (Treg) and effector T cells to rapamycin. *PLoS One*. 2009;4(6).
167. Karakhanova S, Munder M, Schneider M, Bonyhadi M, Ho AD, Goerner M. Highly efficient expansion of human CD4+CD25+ regulatory T cells for cellular immunotherapy in patients with graft-versus-host disease. *J Immunother*. 2006;29(3):336–49.
168. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 2007;110(4):1225–32.
169. Durand M, Dubois F, Dejou C, Durand E, Danger R, Chesneau M, et al. Increased degradation of ATP is driven by memory regulatory T cells in kidney transplantation tolerance. *Kidney Int*. 2018;93(5):1154–64.
170. Zhang H, Xia Y, Ye Q, Yu F, Zhu W, Li P, et al. In vivo expansion of regulatory T cells with IL-2/IL-2 antibody complex protects against transient ischemic stroke. *J Neurosci*. 2018;38(47):10168–79.
171. Schuler PJ, Schilling B, Harasymczuk M, Hoffmann TK, Johnson J, Lang S, et al. Phenotypic and functional characteristics of CD4+CD39+ FOXP3+ and CD4+CD39+FOXP3neg T-cell subsets in cancer patients. *Eur J Immunol*. 2012;42(7):1876–85.
172. Timperi E, Barnaba V. CD39 Regulation and Functions in T Cells. *Int J Mol Sci*. 2021;22(15):1–13.
173. Pallett LJ, Davies J, Colbeck EJ, Robertson F, Hansi N, Easom NJW, et al. IL-2high tissue-resident T cells in the human liver: Sentinels for hepatotropic infection. *J Exp Med*. 2017;214(6):1567–80.
174. Strunz B, Bister J, Jönsson H, Filipovic I, Crona-Guterstam Y, Kvedaraite E, et al. Continuous human uterine NK cell differentiation in response to endometrial regeneration and pregnancy. Vol. 6, *Science Immunology*. 2021.
175. Chen Y-B, Efebera YA, Johnston L, Ball ED, Avigan D, Lekakis LJ, et al. Increased Foxp3+ Helios+ regulatory T cells and decreased acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in patients receiving sirolimus and RGI-2001, an activator of invariant natural killer T cells. *Physiol Behav*. 2017;23(4):625–34.
176. Revilla-Nuin B, de Bejar Á, Martínez-Alarcón L, Herrero JI, Martínez-Cáceres CM, Ramírez P, et al. Differential profile of activated regulatory T cell subsets and microRNAs in tolerant liver transplant recipients. *Liver Transplant*. 2017;23(7):933–45.
177. Jain N, Nguyen H, Chambers C, Kang J. Dual function of CTLA-4 in regulatory T cells and conventional T cells to prevent multiorgan autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(4):1524–8.
178. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, et al. FOXP3 Controls Regulatory T Cell Function through Cooperation with NFAT. *Cell*. 2006;126(2):375–87.
179. Zhou G, Ding Z-C, Fu J, Levitsky HI. Presentation of Acquired Peptide-MHC Class II Ligands by CD4 + Regulatory T Cells or Helper Cells Differentially Regulates Antigen-Specific CD4 + T Cell Response. *J Immunol*. 2011;186(4):2148–55.
180. Maruhashi T, Sugiura D, Okazaki IM, Okazaki T. LAG-3: from molecular functions to clinical applications. *J Immunother cancer*. 2020;8(2).
181. Graydon CG, Mohideen S, Fowke KR. LAG3's Enigmatic Mechanism of Action. *Front Immunol*. 2021;11(January):1–7.
182. Lee I, Wang L, Wells AD, Dorf ME, Ozkaynak E, Hancock WW. Recruitment of Foxp3+ T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor. *J Exp Med*. 2005;201(7):1037–44.
183. Kerdiles YM, Beisner DR, Tinoco R, Dejean AS, Diego H, Depinho RA, et al. Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nat Immunol*. 2009;10(2):176–84.
184. Mcmurchy AN, Levings MK. Suppression assays with human T regulatory cells: A technical guide. *Eur J*

- Immunol. 2012;42(1):27–34.
185. Remedios KA, Zirak B, Sandoval PM, Lowe MM, Boda D, Henley E, et al. The TNFRSF members CD27 and OX40 coordinately limit TH17 differentiation in regulatory T cells. *Sci Immunol.* 2018;3(30):1–14.
186. Mathew JM, H-Voss J, LeFever A, Konieczna I, Stratton C, He J, et al. A Phase I Clinical Trial with Ex Vivo Expanded Recipient Regulatory T cells in Living Donor Kidney Transplants. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–12.

14. Anexos

14.1. Reactivos

PBS 10X (0.5 L)

- NaH₂PO₄ 1.28 g
- Na₂HPO₄ 11.24 g
- H₂O 250 mL
- NaCl 43.83 g
- Ajustar pH a 7.3 con HCl o NaOH y aforar con agua destilada a 500 mL

Medio de expansión (40 mL)

- Optimizer TM T Cell Expansion Supplement 1040 µL
- L-Glutamina 400 µL
- Anti-biótico/Anti-micótico 400 µL
- Suero Humano AB 400 µL
- Optimizer T Cell Expansium Basal Medium 37.76 mL

Medio RPMI suplementado (100 mL)

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

Medio de cultivo para Células Dendríticas (20 mL)

- L-Glutamina 200 µL
- Antibióticos/Antimicóticos 100x 200 µL
- Aminoácidos No-Esenciales 200 µL
- Medio de cultivo RPMI 1640 19.2 mL
- Piruvato de sodio 200 µL

Solución amortiguadora MACS (100 mL)

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

Solución amortiguadora FACS (100 mL)

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

14.2. Figuras suplementarias

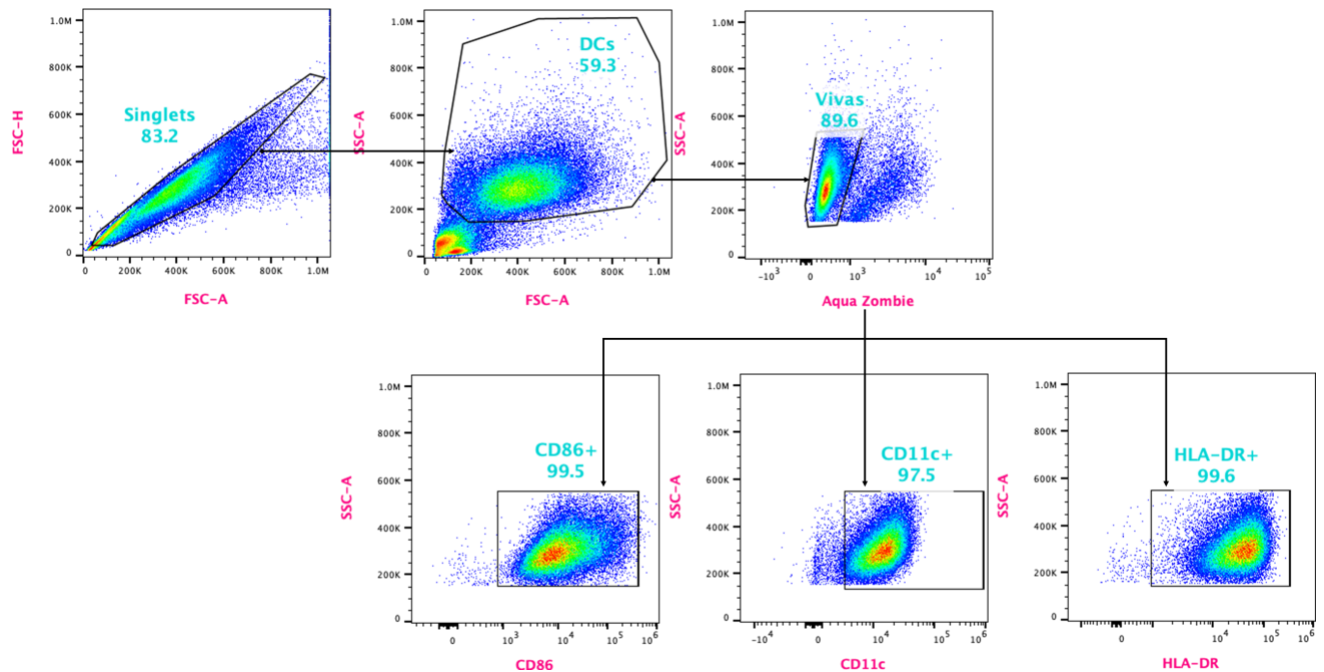


Figura Suplementaria A. Estrategia de análisis del fenotipo de las células dendríticas derivadas de monocitos.

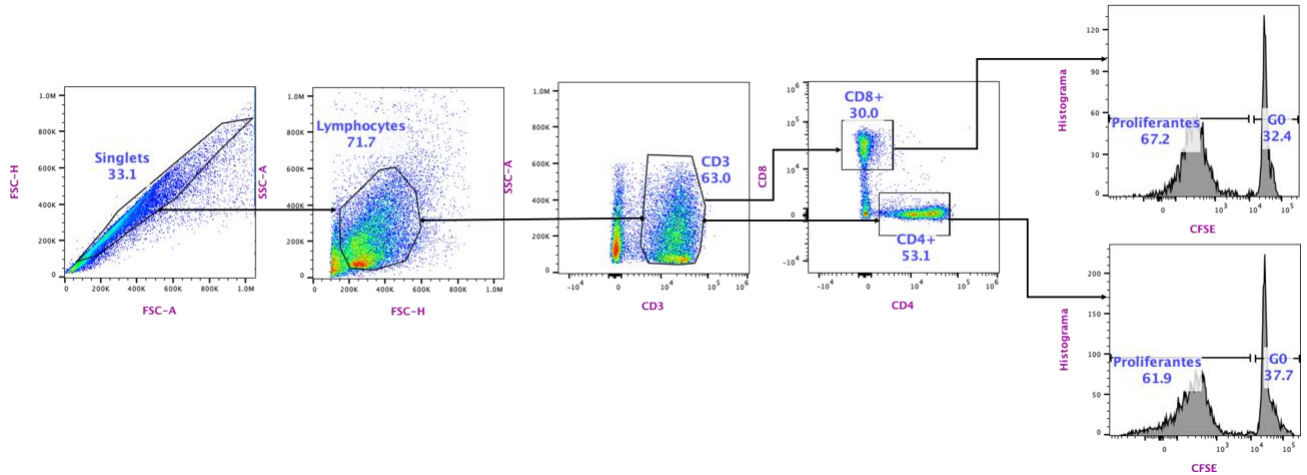


Figura Suplementaria B. Estrategia de análisis de la proliferación de células T aloespecíficas inducida por las células dendríticas derivadas de monocitos alogénicas.

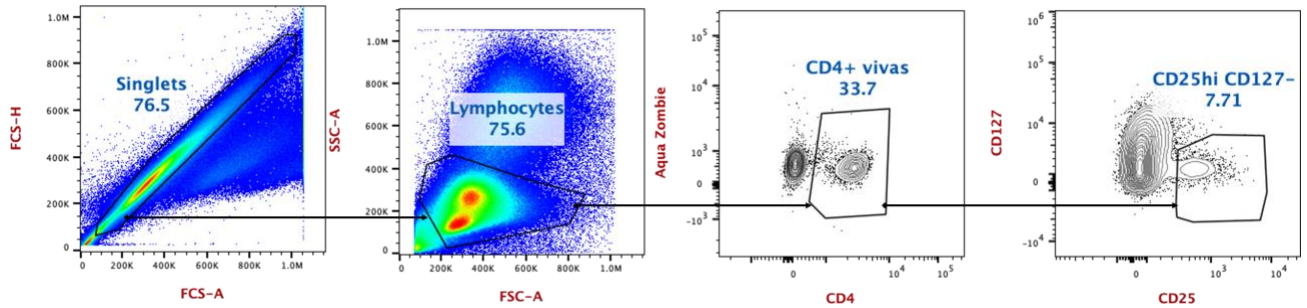


Figura Suplementaria C. Estrategia de análisis para la purificación de células Tregs $CD4^+CD25^{hi}CD127^-$ mediante citometría de flujo.

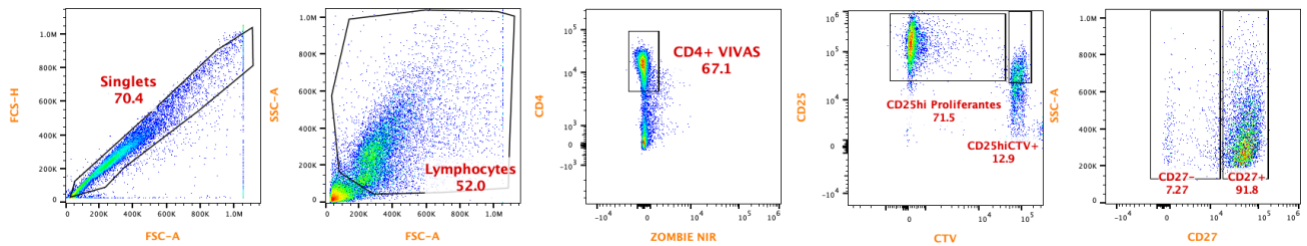


Figura Suplementaria D. Estrategia para el análisis de la proliferación y purificación de células Tregs ($CD4^+CD25^{hi}CTV^-CD27^+$) aloespecíficas inducida por las células dendríticas alogénicas.

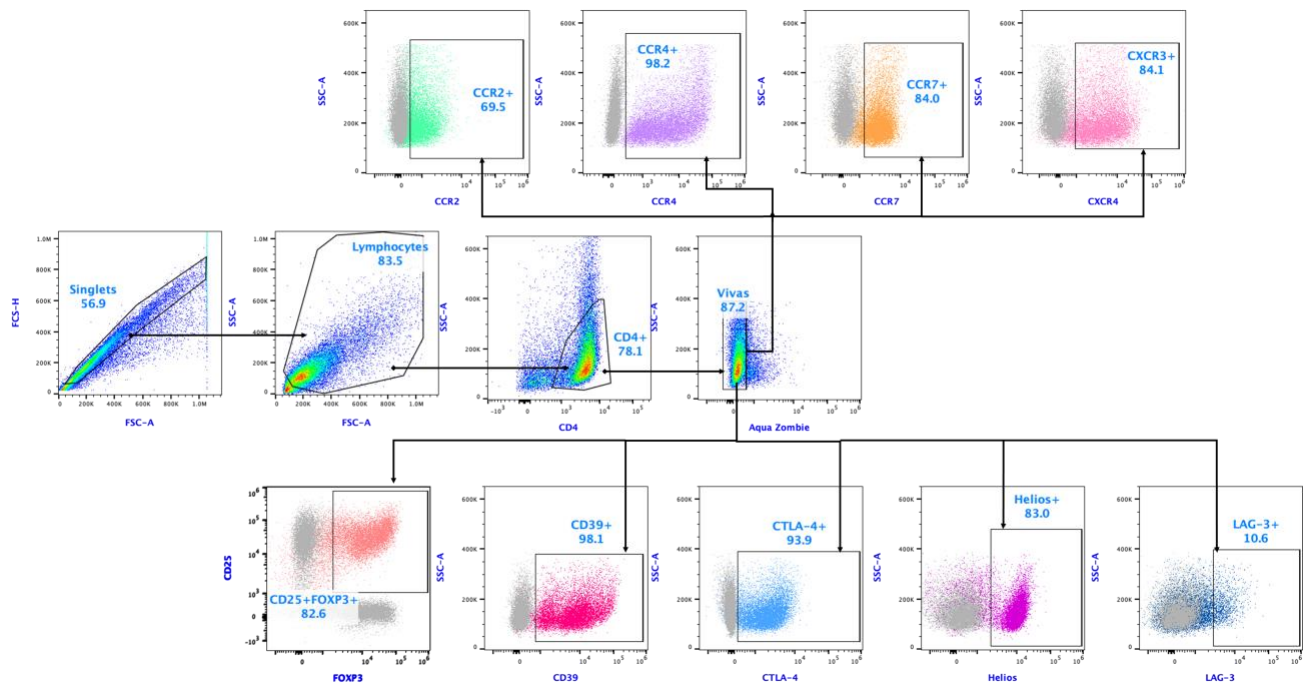


Figura Suplementaria E. Estrategia de análisis para evaluar el fenotipo de células Tregs aloespecíficas expandidas policlionalmente durante tres semanas.

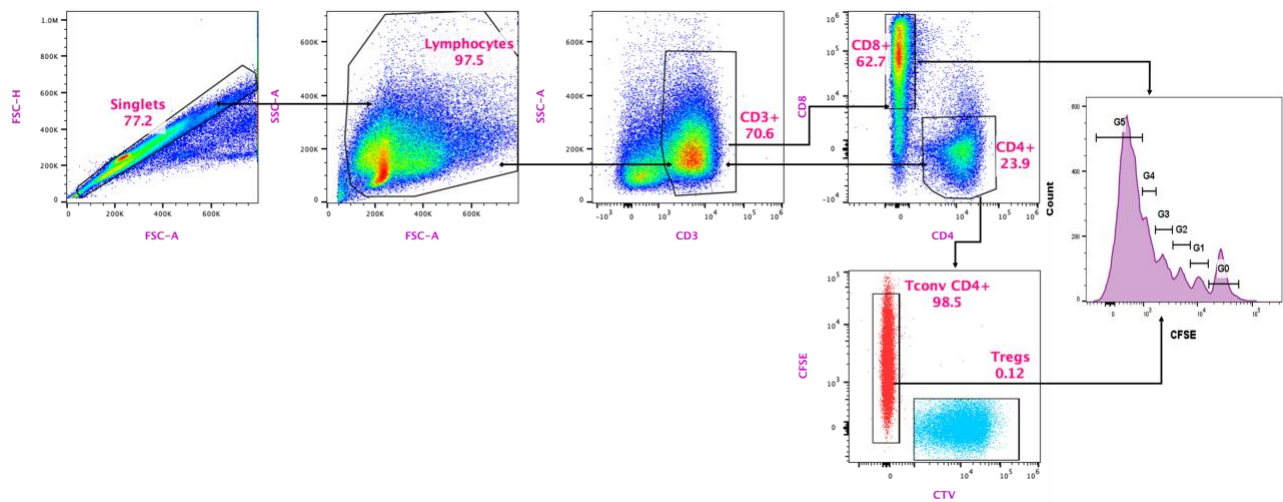


Figura Suplementaria F. Estrategia de análisis de los ensayos de supresión de la proliferación de células T antígeno-específico.