

---

# Universidad de Valladolid

## Facultad de Medicina

Departamento de Medicina, Dermatología y Toxicología

TESIS DOCTORAL:

# "Tolerancia Inmunológica en Trasplante Renal"

Presentada por:

FRANCISCO MAGNO HERRERA GÓMEZ

Para optar el grado de  
DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

Directores:

JESÚS BUSTAMANTE BUSTAMANTE  
RAÚL ORTIZ DE LEJARAZU LEONARDO

Valladolid 2014





**Jesús Bustamante Bustamante**, Profesor Emérito de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid

y

**Raúl Ortiz de Lejarazu Leonardo**, Profesor Titular de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid

CERTIFICAN:

Que han dirigido el trabajo titulado “**TOLERANCIA INMUNOLÓGICA EN TRASPLANTE RENAL**”, realizado por Don Francisco Magno Herrera Gómez y que, habiéndose concluído, lo consideran apto para su pública defensa como tesis doctoral.

Para que conste donde convenga, firman en Valladolid a 5 de Junio de 2014

Prof. Jesús Bustamante Bustamante

Prof. Raúl Ortiz de Lejarazu Leonardo





A mi padre que no puede acompañarme  
en este gran paso que estoy dando





Esta tesis doctoral ha sido posible gracias a:

Proyecto IMMUMON-KT (IMMUnological MONitoring in Kidney Transplantation)

Coordinación: Universidad François-Rabelais de Tours, Francia

Financiación: Séptimo Programa Marco I + D (2007-2013)

Objetivo: Desarrollar una actitud preventiva contra el rechazo del alo-injerto y las complicaciones asociadas a la inmunosupresión mediante el inmunocontrol del trasplantado renal.



# AGRADECIMIENTOS



Me gustaría comenzar mencionando al Profesor Jesús Bustamante Bustamante, Profesor Emérito de la Universidad de Valladolid, uno de los directores de esta tesis doctoral. Quiero agradecerle profundamente su paciencia, su ilusión por la puesta en ruedas de este proyecto, y por el ánimo que me ha transmitido y me sigue transmitiendo cada día. Este momento no hubiera llegado sin él. Quiero agradecerle además porque, como él, entiendo que es posible buscar la santidad en el quehacer diario, y que transmitir el conocimiento es una de las cosas que más agrada a Dios.

Doy infinitas gracias al Profesor Raúl Ortiz de Lejarazu Leonardo, Profesor Titular de Microbiología de la Universidad de Valladolid, también director de esta tesis doctoral. Quiero agradecerle el haberme permitido realizar este trabajo en las instalaciones de su servicio y por haberme ayudado en su realización. Muchas gracias por haberme acompañado hasta el finiquito del último de los detalles del mismo y en la redacción de la presente memoria. "El trabajo ahora destila ciencia".

A la Profesora Déborah Fritz del Servicio de Nefrología e Inmunología Clínica del Hospital Bretonneau de Tours en Francia, quien dirige la implementación del inmunocontrol del trasplantado renal en Europa. Sumados a ella, muchas gracias también a los Profesores Christian Genin del Laboratorio de Inmunología Clínica y Christophe Mariat del Servicio de Nefrología, Diálisis y Trasplante Renal del CHU de Saint-Étienne, también en Francia. Despertar el interés de los nefrólogos por el inmunocontrol del trasplantado renal ha sido y sigue siendo a día de hoy todo un reto, fundamentalmente por el entendimiento de los complejos mecanismos inmunológicos y no inmunológicos que yacen detrás.

Al Doctor Claude Lambert del Laboratorio de Inmunología Clínica del CHU de Saint-Étienne, quien me enseñó a andar por el mundo de la citometría de flujo y no me dejó de apoyar cuando poníamos a punto la determinación de Tregs en este hospital.

De manera muy especial a la Doctora Mercedes Nocito Colón del Laboratorio de Inmunología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, por su ímpetu y constancia durante todo el duro camino que recorrimos juntos para hacer realidad este proyecto.

Al Doctor Jesús Bermejo Martín y la Bioestadístico MariFe Muñoz Moreno de la Unidad de Investigación Biomédica del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, por su ayuda en la estructuración respecto a los métodos y con el programa estadístico para el análisis de nuestros resultados, que fueron vitales para la consumación del presente trabajo.

Al Doctor Jesús Grande Villoria del Servicio de Nefrología del Hospital "Virgen de la Concha" de Zamora, quien es actualmente el impulsor del inmunocontrol del trasplantado renal en Castilla y León.

Al personal de enfermería del Laboratorio Central del Hospital Clínico Universitario de Valladolid. A todos los médicos, enfermeras y auxiliares de enfermería de los Servicios de Nefrología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid y del Hospital "Virgen de la Concha" de Zamora, lo mismo que a todos los médicos y técnicos de laboratorio del Servicio de Microbiología e Inmunología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, quienes de cerca o de lejos me mostraron su apoyo durante este difícil tramo.

A Débora, el gran amor de mi vida, porque sin ella hubiera sido imposible llegar a este culmem. Ya podría yo tocar el sol y vaciar el mar, o pintar de color la luz, y hacer dulce la sal, ser profeta del porvenir y romper el aire. Pero si me falta tu amor yo no soy nada. A Fran, por darle ese gusto a dulzura a todo lo que hago, a lo que me quita el sueño cada día, y a lo que me toca pasar. A Maribel, que me quiso como a un hijo, ella nos guarda y da fortaleza cuando todo parece sucumbir. A Donaciano, por su tesón. A Felisa Martín Sáez, porque las puertas de su casa están siempre abiertas y su cariño es incondicional.

A mi madre, porque si las matemáticas no las aprendí con ella, aprendí que la lógica es lo que mueve la física de este mundo pero el amor, ente intangible, lo que multiplica la felicidad y eleva a la "n" potencia el éxito.

A Francisco Eumelio Herrera Romero, mi padre, a quien definiría como un "Pachacutec" (en quechua, el que cambia la tierra), un emprendedor nato, un estratega, la cabeza de la minería peruana cuando tuvo que partir, mi maestro de aquellas cosas que no se enseñan ni se aprenden en la universidad. A él, que no puede acompañarme en este gran paso que estoy dando, agradezco infinitamente por haberme hecho quien soy, y a él dedico este trabajo.

A mi tía María Jesús, porque en su casa fui un hijo más a quien querer, por quien velar y sacar adelante. Y junto a ella a Pedro De Rosas y Lola Vélez, quienes vendían en la tienda de mi tía del 18 de la Paloma en Burgos, porque no escatimaron en ternura y cariño. Sin olvidar a Miguel Quintanilla, fueron mi única familia durante mis primeros años de formación como nefrólogo en España. Pura energía positiva.

A Guy Bugnazet y mi hermana Gabriela, por haberme acogido con el lujo que permite la simpleza y el amor que emana del desprendimiento, durante mi formación como inmunólogo en Saint-Étienne. Junto a ellos quiero agradecer además a Basile Bugnazet, ahora gozando de la gloria de nuestro señor, a su esposa Lucette, y a sus hijos Philippe, Marise, y Marie-Jo. Sumo a Jean-Claude Boutet y a su esposa Claire, a David Montagnon y a Stéphanie "Villette", a Sébastien Demosthenis, y a "Garago". Lejos de los míos y de mi lugar, fui uno más de la familia en el irreductible pueblo de galos de Saint-Romain-les-Atheux.

A todos ellos, nuevamente, muchas gracias.

# ÍNDICE



# ÍNDICE

|   |              |
|---|--------------|
| ABREVIATURAS  | 21           |
| TABLAS  | 25           |
| FIGURAS   | 27           |
| <hr/>   |              |
| <b>1. Resumen</b>   | <b>29-32</b> |
| <b>2. Introducción</b>  | <b>33-84</b> |
| 2.1 Células reguladoras Foxp3 <sup>+</sup>                                    | 35           |
| 2.1.1 Generalidades   | 35           |
| 2.1.2 Ontogenia y homeostasis de las células T reguladoras Foxp3 <sup>+</sup> | 37           |
| 2.1.3 Direccionamiento, expansión y modo de acción                            | 39           |
| 2.1.4 Rol de las células reguladoras en patología humana                      | 42           |
| 2.2 Células reguladoras y riñón   | 44           |
| 2.2.1 Afectación renal en el síndrome IPEX                                    | 44           |
| 2.2.2 Otras nefropatías   | 46           |
| 2.3 Células reguladoras en trasplante renal                                   | 47           |
| 2.3.1 Modelos experimentales  | 47           |
| 2.3.2 Pruebas de la existencia de inmunotolerancia en trasplante renal        | 50           |
| 2.3.3 Límites de las estrategias de inducción de tolerancia en el ser humano  | 51           |
| 2.3.4 Los progresos alcanzados  | 53           |
| 2.4 Correlaciones clínicas  | 56           |
| 2.4.1 Rechazo agudo celular   | 56           |
| 2.4.2 Disfunción crónica del injerto  | 58           |
| 2.4.3 Impacto de los factores externos en la biología de los Tregs            | 63           |

|   |               |
|---|---------------|
| 2.4.4 Infecciones, Tregs e inhibidores de mTOR                        | 67            |
| 2.4.5 Cánceres y tolerancia   | 73            |
| 2.4.6 Aterosclerosis e inmunotolerancia                               | 75            |
| 2.5 Necesidad de seguimiento inmunológico del paciente trasplantado   | 78            |
| 2.5.1 Implementación del inmunocontrol                                | 78            |
| <b>3. Hipótesis de trabajo y objetivos</b>                            | <b>85-90</b>  |
| 3.1 Hipótesis de trabajo  | 87            |
| 3.2 Objetivos primarios   | 88            |
| 3.3 Objetivos secundarios   | 88            |
| <b>4. Material y métodos</b>  | <b>91-124</b> |
| 4.1 Diseño del estudio  | 93            |
| 4.2 Población de estudio  | 94            |
| 4.3 Población control   | 94            |
| 4.4 Comité de ética y consentimiento informado                        | 95            |
| 4.5 Criterios de inclusión y exclusión                                | 95            |
| 4.5.1 Subestudio 1  | 95            |
| 4.5.2 Subestudio 2  | 97            |
| 4.6 Metodología   | 98            |
| 4.6.1 Muestras recogidas  | 98            |
| 4.6.2 Cuantificación de células T reguladoras por citometría de flujo | 99            |
| 4.6.3 Definición de los umbrales de normalidad                        | 113           |
| 4.6.4 Porcentaje de Tregs por inmunosupresor                          | 114           |
| 4.6.5 La consulta de revisión   | 114           |
| 4.7 Variables recogidas   | 121           |
| 4.7.1 Determinación de Tregs  | 121           |
| 4.7.2 Inmunoscontrol  | 121           |
| 4.8 Método estadístico  | 123           |
| 4.8.1 Análisis descriptivo  | 123           |
| 4.8.2 Análisis bivariante   | 124           |
| 4.8.3 Análisis multivariante  | 124           |

|  |                |
|--|----------------|
| <b>5. Resultados</b>   | <b>125-144</b> |
| 5.1 Análisis descriptivo   | 127            |
| 5.1.1 Subestudio 1   | 127            |
| 5.1.2 Subestudio 2   | 133            |
| 5.1.3 Predicción de la propensión al rechazo del alo-injerto                   | 135            |
| 5.1.4 Predicción de la propensión a cánceres e infecciones en el postrasplante | 137            |
| 5.2 Análisis comparativo   | 142            |
| 5.2.1 Umbrales de Tregs en trasplantados y población sana                      | 142            |
| 5.2.2 Porcentajes de Tregs con anticalcineurínicos e inhibidores de mTOR       | 143            |
| <b>6. Discusión</b>  | <b>145-170</b> |
| 6.1 Puesta a punto de la determinación de Tregs                                | 148            |
| 6.2 Comparando a los anticalcineurínicos con los inhibidores de mTOR           | 151            |
| 6.3 Expresión clínica de la dinámica de la población Treg                      | 156            |
| 6.3.1 Prevención del rechazo del alo-injerto                                   | 156            |
| 6.3.2 Prevención de los cánceres e infecciones del postrasplante               | 164            |
| <b>7. Conclusiones</b>   | <b>171-176</b> |
| <b>8. Anexos</b>   | <b>177-196</b> |
| Anexo 1: Score de Tolerancia a Inmunológica Clínica                            | 179            |
| Anexo 2: consentimiento informado  | 183            |
| Anexo 3: Sistema BD FACSCalibur™   | 187            |
| Anexo 4: BD Pharmingen™ Human Regulatory T Cell Cocktail                       | 193            |
| <b>9. Bibliografía</b>   | <b>197-224</b> |



# ABREVIATURAS

|              |   |
|--------------|---|
| ADA:         | American Diabetes Association   |
| AEE:         | Agentes Estimulantes de la Eritropoyesis  |
| Akt:         | Akt kinase  |
| Alexa Fluor: | Conjugado de anticuerpos fluorescentes  |
| ANCA:        | Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies  |
| APC:         | Aloficocianina  |
| ARN:         | Ácido ribonucléico  |
| ATG:         | Anti-timoglobulina  |
| ATP:         | Adenosine triphosphate  |
| AZA:         | Azatioprina   |
| CCL:         | Chemokine (C-C motif) ligand  |
| CCR:         | C-C chemokine receptor  |
| CD:          | Cúmulo de Diferenciación  |
| CEC:         | Carcinoma Epidermoide Cutáneo   |
| CLA:         | Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen   |
| CMH:         | Complejo Mayor de Histocompatibilidad   |
| CMV:         | Citomegalovirus   |
| CPA:         | Célula Presentadora de Antígenos  |
| CpG:         | Cytosine triphosphate deoxynucleotide-phosphodiester-Guanine triphosphate deoxynucleotide |

|                 |   |
|-----------------|---|
| CTLA-4:         | Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen-4           |
| CsA:            | Ciclosporina A  |
| Cy:             | Cianina   |
| DCs:            | Dendritic cells                                       |
| EBV:            | Epstein-Barr virus                                    |
| EDTA:           | Ethylenediaminetetraacetic acid                       |
| ELISPOT:        | Enzyme-linked immunospot                              |
| ERC:            | Enfermedad Renal Crónica                              |
| ESH/ESC:        | Sociedades Europeas de Hipertensión y Cardiología     |
| FA:             | Fibrilación Auricular                                 |
| FITC:           | Isotiocianato de fluoresceína                         |
| FG:             | Filtrado Glomerular                                   |
| Foxo:           | Forkhead box protein O                                |
| Foxp3:          | Forkhead box p3                                       |
| FRET:           | Fluorescence resonance energy transfer                |
| FSC:            | Forward Scatter                                       |
| GITR:           | Glucocorticoid Induced Tumor necrosis factor Receptor |
| GZM A/B:        | Granzima A/B  |
| JAK3:           | Janus kinase 3  |
| HCUV:           | Hospital Clínico Universitario de Valladolid          |
| HHV8:           | Human Herpesvirus-8                                   |
| HLA:            | Human Leukocyte Antigen                               |
| ICN:            | Inhibidores de la Calcineurina                        |
| IDO:            | Indoleamina 2,3 di-oxigenasa                          |
| IFN- $\alpha$ : | Interferon- $\alpha$                                  |
| IFN- $\gamma$ : | Interféron- $\gamma$                                  |

|         |  |
|---------|--|
| IHQ:    | Immunohistoquímica   |
| IL2R:   | Receptor de interleuquina-2                                  |
| IL:     | Interleuquina  |
| ImTOR:  | Inhibidores de mTOR  |
| IPEX:   | Immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked |
| iTreg:  | Linfocito T regulador inducible                              |
| KDIGO:  | Kidney Disease: Improving Global Outcomes                    |
| LAG-3:  | Lymphocyte-activation gene 3                                 |
| LIF:    | Leukemia Inhibitory Factor                                   |
| LPS:    | Lipopolisacárido   |
| M6PR:   | Mannose-6-phosphate receptor                                 |
| MAPK:   | Mitogen-activated protein kinase                             |
| MBG:    | Membrana Basal Glomerular                                    |
| MDC:    | Macrophage-derived chemokine                                 |
| MFI:    | Mean Fluorescence Intensity                                  |
| miR155: | MicroRNA 155   |
| MMF:    | Micofenolato mofetil   |
| mTOR:   | mammalian Target Of Rapamycin                                |
| mTORC:  | mammalian Target Of Rapamycin Complex                        |
| NFAT:   | Nuclear Factor of Activated T-cells                          |
| NFκB:   | Nuclear Factor κB  |
| NK:     | Natural Killer   |
| NKT:    | Natural Killer T   |
| nTreg:  | Linfocito T regulador natural                                |
| PCR:    | Proteína-C reactiva  |
| PD-1:   | Programmed cell death 1                                      |

|                 |   |
|-----------------|---|
| PD-L1:          | Programmed cell death ligand 1                  |
| PE:             | Ficoeritrina                                    |
| PerCP:          | Peridin clorofil proteína                       |
| PI3K:           | Phosphoinositide 3-kinase                       |
| Pim-2:          | Pim-2 kinase                                    |
| PKC $\theta$ :  | Protein kinase C theta                          |
| RT-PCR:         | Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction |
| SCA:            | Síndrome Coronario Agudo                        |
| SSC:            | Side Scatter                                    |
| STIC:           | Score de Tolerancia Inmunológica Clínica        |
| TCD4:           | Células T CD4 <sup>+</sup>                      |
| Tconv:          | Linfocito T convencional                        |
| TCR:            | T cell receptor                                 |
| Tefec:          | Célula T efectora                               |
| TGF- $\beta$ :  | Transforming Growth Factor- $\beta$             |
| Th1:            | Linfocito T helper-1                            |
| Th3:            | Linfocito T helper-3                            |
| Th17:           | Linfocito T helper-17                           |
| TNF- $\alpha$ : | Tumor Necrosis Factor- $\alpha$                 |
| Tr1:            | Linfocito T regulador productor de IL-10        |
| Treg:           | Linfocito T regulador Foxp3 <sup>+</sup>        |
| TSLP:           | Thymic stromal lymphopoietic                    |
| TSDR:           | Natural Foxp3 Treg-specific demethylated region |
| VIH:            | Virus de la Inmunodeficiencia Humana            |
| VSG:            | Velocidad de Sedimentación Globular             |
| VZV:            | Varicella Zoster Virus                          |

# TABLAS

**Tabla 1.—Porcentajes de Tregs por inmunosupresor (Subestudio 1)**

**Tabla 2.—Causas de un STIC favorable (Subestudio 1)**

**Tabla 3.—Causas de un STIC desfavorable (Subestudio 1)**

**Tabla 4.—Enfermedades y porcentajes de Tregs (Subestudio 2)**



# FIGURAS

**Figura 1.—Mecanismos de acción de los Tregs**

**Figura 2.—Injerencia de las condiciones postrasplante en la biología y función de los Tregs**

**Figura 3.—Celda de flujo laminar FACSCalibur™ (BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.)**

**Figura 4.—Citómetro de flujo BD FACSCalibur™**

**Figure 5.—Componentes del sistema óptico BD FACSCalibur™**

**Figure 6.—Ejemplo de cuantificación de linfocitos Treg por citometría de flujo**

**Figure 7.—STIC favorable y desfavorable (Subestudio 1)**

**Figure 8.—STIC favorable y desfavorable (Subestudio 2)**

**Figura 9.—Diferencias significativas entre anticalcineurínicos e inhibidores de mTOR**

# 1. Resumen



# 1. Resumen

El papel crucial de las células T reguladoras en la tolerancia de los injertos se ha visto claramente en numerosos modelos animales. No obstante, delimitar este rol en trasplante con humanos es complicado. Alternativamente, la exploración del componente regulador de la respuesta alo-inmune podría convertirse en un biomarcador diagnóstico y pronóstico muy útil para el seguimiento a largo plazo de los pacientes trasplantados. Las células T reguladoras circulantes se correlacionan con la tasa de filtrado glomerular, con una influencia importante de la insuficiencia renal y de la inmunosupresión sobre el número y función de las mismas, además de otras situaciones que también pueden oponerse a una regulación de la respuesta inmune por estas células, favoreciendo un estado pro-inflamatorio persistente, y predisponiendo al rechazo. Si la adquisición o restauración de un estado de tolerancia inmunitaria constituye uno de los objetivos principales en trasplante, éste es por el contrario deletérea para la respuesta contra agentes infecciosos y células tumorales. La comunidad científica plantea poder inducir un estado de "tolerancia operacional", es decir la ausencia de respuesta inmunitaria patógena frente a los antígenos del injerto, sin que se afecte la capacidad del receptor para reaccionar de manera eficaz contra diversos antígenos exógenos. No obstante, los nexos entre células reguladoras y la malignidad o las infecciones en el postrasplante no se conocen bien del todo, sobre todo si se quiere entender los mecanismos en juego bajo la influencia de la inmunosupresión. De momento, el seguimiento del número circulante de estas células en el trasplante renal puede alertar de una predisposición al rechazo en

caso de recuentos bajos en un contexto clínico a favor de un estado pro-inflamatorio. Igualmente, los recuentos altos pueden dejar entrever una predisposición al desarrollo de cánceres e infecciones, que la inmunosupresión puede influenciar vía mecanismos tolerógenos y no tolerógenos.

# 2. Introducción



## 2. Introducción

Controvertida desde hace mucho, la existencia de las células T supresoras se restableció a mediados de los años 90 bajo la denominación de linfocitos T reguladores. En el curso de estos últimos años, han sido objeto de un número exponencial de publicaciones, reflejo del entusiasmo suscitado. La razón es doble; por una parte da testimonio de un avance muy importante en el entendimiento del control de la respuesta inmune adaptativa, por otra parte la esperanza de una manipulación selectiva de esta población linfocitaria abre perspectivas terapéuticas fascinantes.

### 2.1 Células reguladoras Foxp3<sup>+</sup>

#### 2.1.1 Generalidades

Las células reguladoras están compuestas por diferentes subpoblaciones que comparten la propiedad de modular la respuesta inmune. Las células T reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> (Treg) se han convertido en sus principales representantes, debido a una

caracterización fenotípica y molecular robusta, su identificación en diferentes especies, y por el papel crucial que juegan en fisiología y fisiopatología del sistema inmune.

En 1995, linfocitos CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Foxp3<sup>+</sup> con propiedades supresoras se describen en el ratón [1]. Un contingente similar es identificado algunos años más tarde en el humano [2]. La expresión de la molécula CD25 (cadena alfa del receptor de IL-2) no es específica de los linfocitos T reguladores y podemos encontrarla también, al menos transitoriamente, en los linfocitos T activados. La molécula de co-estimulación inhibitoria CTLA-4, el TGF-beta de membrana, el receptor GITR, la neurofilina-1 y la integrina CD103 son igualmente expresadas por esta población pero ninguna es específica ni mucho menos de la misma. La identificación del gen *Foxp3*, que expresa selectivamente esta población, constituye un progreso decisivo para su caracterización y estudio [3-6]. Los mecanismos inmunomoduladores dependientes del factor de transcripción Foxp3 se conocen sólo parcialmente, parece que ligándose a ciertos componentes de la familia Rel, NFAT y NFκB, inhibe su actividad transcripcional (IL-2, IL-4, IFN-γ) [7].

El rol fisiológico de las células reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> y sus implicancias en patología son múltiples. Inicialmente se las vinculó al control de los linfocitos autorreactivos [1] y de aquellos reactivos contra a la flora del tubo digestivo [8]. Estas células participan en el mantenimiento homeostático de los diferentes compartimentos linfocitarios T [9-11] y B [12]. Contribuyen modulando la respuesta inmunitaria de todo tipo, en trasplante alogénico [13], durante el embarazo [14], en la respuesta antitumoral [15], en la alergia [16] y en las infecciones [17].

## 2.1.2 Ontogenia y homeostasis de las células T reguladoras Foxp3<sup>+</sup>

En situación fisiológica, la producción tímica contribuye mayoritariamente a la constitución del compartimento linfocitario regulador periférico. La orientación de timocitos humanos hacia la línea de las células T reguladoras denominadas naturales (nTreg) depende de su interacción con las células dendríticas de los corpúsculos de Hassall [18]. Estas últimas, activadas al contacto con el epitelio medular a través de la molécula TSLP, presentan el complejo HLA-péptido y expresan fuertemente las moléculas CD80/CD86. Ellas permiten así la activación del TCR y de la molécula CD28 del timocito, condición indispensable en la ontogenia de la célula reguladora [19]. Lo importante de la señal transmitida por el TCR adquiere relevancia con las observaciones de los déficits específicos en células reguladoras observados en animales deficientes para uno de los componentes de la vía de señalización de NFκB dependiente del TCR (PKC-θ<sup>-/-</sup>, BCL-10<sup>-/-</sup>, IKK2<sup>-/-</sup>) [20].

Las señales implicadas en la homeostasis de la población reguladora de origen tímico en periferia (bazo, ganglios) se conocen menos. Estas parecen depender de la secreción de IL-2 por otros linfocitos [21, 22], pero también de la interacción entre el TCR de las células reguladoras con su ligando antigénico [23]. La interacción de la molécula de co-señal CD28 de la célula reguladora con su ligando B7 es igualmente indispensable para su mantenimiento en periferia [24].

Además de las células T reguladoras naturales, se ha demostrado *in vitro* e *in vivo* la existencia de dos subtipos de células T reguladoras denominadas adaptativas o inducibles (iTreg) pues aparecen tras la diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> nativos en periferia bajo condiciones especiales [25, 26]: 1) los iTregs propiamente dichos (Th3) generados *in vitro* e *in vivo* a partir de células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> por contacto de su TCR con el antígeno en presencia de TGF- $\beta$ , con todas las características fenotípicas y funcionales de los nTregs, y 2) las células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> (Tr1) productoras de IL-10 principalmente y de TGF- $\beta$  por la acción de iTregs Foxp3<sup>+</sup>, pudiendo expresar Foxp3 al activarse y pudiendo generarse *in vitro* e *in vivo* por estimulación antigénica repetida por efecto de IL-10 e INF- $\alpha$ . Las células Tr1 ejercen su acción supresora principalmente mediante la producción de IL-10 y en menor grado por la secreción de TGF- $\beta$ , también lo hacen modulando la activación de células dendríticas y regulando la producción de citoquinas [25]. Las células Tr1 y nTregs podrían controlar sinérgicamente la respuesta alo-inmune en la que los nTregs inducen la diferenciación de linfocitos T nativos en células Tr1 *in vitro* en presencia de células dendríticas alogénicas [25].

Diferentes estímulos positivos se han descrito con capacidad para influenciar la generación de iTregs: IL-2, TGF- $\beta$ , LIF [27], rapamicina (inhibidores de mTOR) [28, 29] y ácido retinoico [30]. Una de las grandes diferencias entre iTregs y nTregs radica en la expresión del gen *Foxp3*, que parece ser menos estable en los primeros, como lo demuestran la metilación y acetilación de sus histonas, y el estado de los microARN [31-33]. Maganto-García [34] ha demostrado recientemente que los iTregs Foxp3<sup>+</sup> – pero no los nTregs – podían interactuar eficazmente con selectinas endoteliales y migrar a través del endotelio activado *in vitro*. Por otra parte, los iTregs Foxp3<sup>+</sup> se adherían al endotelio inflamado *in vivo* y sus productos de secreción bloqueaban la inflamación aguda *in vivo* [34]. Los iTregs Foxp3<sup>+</sup> serían reclutados en el seno de tejidos inflamados para

ayudar a regular la inflamación independientemente de su influencia sobre las células efectoras mediante la supresión directa de la activación endotelial y del reclutamiento leucocitario. Algunos estudios han sugerido que la estimulación del TCR de linfocitos CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> en presencia de TGF- $\beta$  inducía niveles elevados de expresión estable de Foxp3, estos iTregs no eran ni anérgicos ni supresores y producían citoquinas efectoras [25]. Siendo la presencia de citoquinas reguladoras como TGF- $\beta$  necesaria para la generación de iTregs específicos de antígeno in vitro e in vivo tras la presentación de antígenos por parte de células dendríticas inmaduras, en medio pro-inflamatorio las células T nativas prefieren diferenciarse en células Th17 [35-38]. Por este motivo, la transferencia de células reguladoras inducibles generadas in vitro con fines terapéuticos, no siendo estables ni fenotípica ni funcionalmente, podría resultar desalentadora.

### **2.1.3 Direccionamiento, expansión y modo de acción**

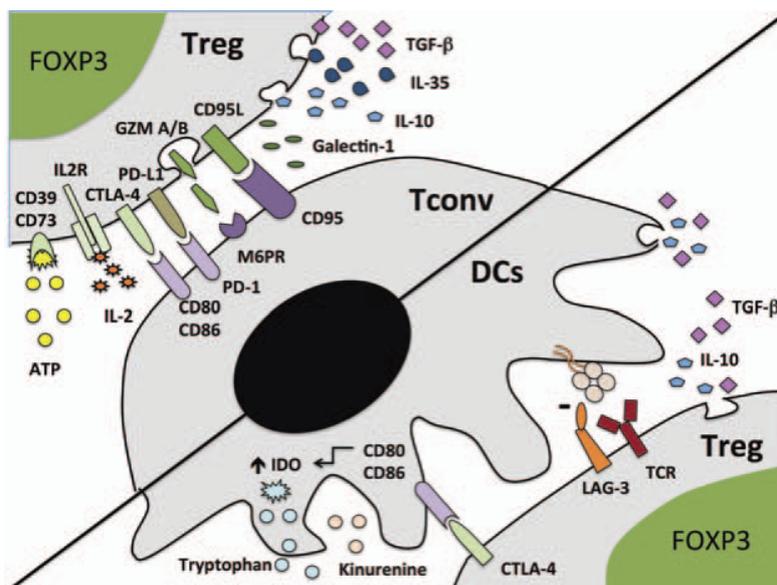
La comprensión de los mecanismos determinantes del direccionamiento de las células reguladoras Foxp3<sup>+</sup> es todo un reto en la perspectiva de la modulación terapéutica de la respuesta supresora. La pareja quimioquina-receptor CCL21 / CCR7 y la expresión de la molécula CD62L son necesarias para la entrada de la célula reguladora en el ganglio de drenaje [39], requisito a su expansión. El receptor CCR4, expresado constitutivamente por la subpoblación CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Foxp3<sup>+</sup> [40], resulta de interés por su efecto quimiotáctico con la molécula CCL22(MDC). Este eje quimiotáctico es el responsable del reclutamiento preferente de células Foxp3<sup>+</sup> en el carcinoma de ovario humano [41] y en un modelo de tolerancia alogénica en el ratón [42]. Además, la integrina CD103 ( $\alpha$ E $\beta$ 4),

que expresan las células F<sub>oxp3</sub><sup>+</sup>, permite la retención de éstas en los epitelios, en particular cutáneo y digestivo [8, 43].

In vivo, las capacidades de proliferación y expansión de las células reguladoras son muy importantes, contrastando con las observaciones de anergia in vitro [44, 45]. La proliferación es específica de antígeno y se produce en el ganglio de drenaje. Algunas células dendríticas, activadas en medio pro-inflamatorio, pueden hacer proliferar células reguladoras y servirse de su efecto supresor [44]. Otras por el contrario, inmaduras y expresando TGF- $\beta$ , favorecen la respuesta supresora sosteniendo selectivamente la expansión de células reguladoras [46]. La capacidad para estimular la respuesta supresora, sin activar la respuesta efectora, constituye sin duda una de las propiedades fundamentales de las células dendríticas denominadas tolerógenas.

Los mecanismos de supresión de las células reguladoras son múltiples (Figura 1). In vitro, dependen exclusivamente del contacto celular y se apoyan en el efecto inmunomodulador de las moléculas CTLA-4 y TGF- $\beta$  [47]. Una de las más importantes consecuencias funcionales del efecto supresor es la inhibición de la secreción de IL-2 por las células efectoras [48]. Por otra parte, la molécula CTLA-4 induce la expresión de la enzima indoleamina 2,3 di-oxigenasa (IDO) en la Célula Presentadora de Antígenos (CPA) [49]. IDO consume el triptófano esencial para la proliferación linfocitaria. Un modo de acción que implica la interacción directa con la célula efectora se ha puesto también de manifiesto [50]. In vivo, la secreción de interleuquina-10 por la célula reguladora, le confiere un efecto supresor a distancia (efecto *by-stander*) [10].

Figura 1.— Mecanismos de acción de los Tregs.



Cuatro modos de acción de base se han descrito: (i) secreción de citoquinas inhibitorias IL-10, IL-35 y TGF-β, que actúan sobre las células T convencionales y células dendríticas; (ii) citólisis por CD95L, granzima y perforina; (iii) perturbación metabólica en relación con una alta afinidad de CD25 secundaria a la privación citoquímica inducida por la apoptosis, consumo de ATP extracelular por CD39 y/o CD73, y (iv) mecanismos que modulan la maduración y/o la función de células dendríticas por HLA-G, LAG3 (CD223) - HLA de clase II dependiente que suprimen la maduración de células dendríticas, y por inducción de IDO CTLA-4 - CD80/CD86 dependiente, que cataliza la degradación de triptófano formando kinurenina intermedia con propiedades inmunomoduladoras. **J. Zuber et al. 2013**

## 2.1.4 Rol de las células reguladoras en patología humana

### CASO PARTICULAR DEL SÍNDROME IPEX

El síndrome IPEX (*immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked*), que afecta exclusivamente a varones, se encuentra ligado a una mutación del gen *Foxp3* situado en el cromosoma X [51]. Este gen se encuentra espontáneamente mutado en el ratón Scurfy en el que los síntomas son caricaturales de la enfermedad humana [52]. El rol determinante del gen *Foxp3* en el desarrollo y función de las células reguladoras se deja entrever por la ausencia de éstas en los niños IPEX, como en su homólogo murino [3, 4]. A este respecto las manifestaciones clínicas del síndrome IPEX ilustran un déficit completo en células reguladoras *Foxp3*<sup>+</sup>. Revelada en los primeros meses de vida, la afección se traduce clásicamente por una enfermedad inflamatoria intestinal responsable de diarrea profusa, diabetes, tiroiditis, y otras enfermedades auto-inmunes, a las que se asocian con frecuencia manifestaciones de atopia (eczema, hiper-IgE) y más raramente un síndrome linfoproliferativo [53]. La evolución es rápidamente fatal en ausencia de tratamiento con alotrasplante de médula ósea [54], alternativa a un enérgico tratamiento inmunosupresor [53].

## PÉRDIDA DE TOLERANCIA

Ciertamente, la mayoría de las enfermedades auto-inmunes no responde a una ecuación monogénica tan simple como la del síndrome IPEX y aparecen en un contexto multifactorial, poligénico y ambiental. Puede que un déficit parcial, cuantitativo o funcional, de las células reguladoras participe en la fisiopatología de diversas enfermedades auto-inmunes. Un déficit de las capacidades funcionales de las células supresoras se ha puesto en evidencia en el síndrome poli-auto-inmune glandular de tipo II [55], la artritis reumatoide [56], la esclerosis múltiple [57] y en la miastenia asociada a timomas [58]. La insuficiencia de esta población se encuentra implicada con manifestaciones atópicas precoces [59] y enteropatías inflamatorias [60].

## GANANCIA DE TOLERANCIA

Si la adquisición o restauración de un estado de tolerancia inmunológica constituye uno de los objetivos principales en trasplante y en enfermedades auto-inmunes, es por el contrario deletérea para la respuesta contra agentes infecciosos y células tumorales. Ciertos patógenos, en particular viral (VIH [61]) y parasitario (*Leishmaniae* [62], *Plasmodium* [63]), pueden evadir una respuesta inmunitaria eficaz mediante el reclutamiento y expansión preferente de células reguladoras  $\text{Foxp3}^+$ . Los mecanismos implicados se desconocen todavía.

La responsabilidad atribuida a las células reguladoras en la anergia del sistema inmunitario frente a las células tumorales las ubica en el centro de las nuevas estrategias

de inmunoterapia antitumoral. Se reclutarían células reguladoras *Foxp3*<sup>+</sup> en el seno de los tumores por la quimioquina CCL22(MDC), para la que estas células expresan el receptor CCR4 [41]. Las células dendríticas inmaduras secretando TGF- $\beta$  favorecerían la expansión preferente de estas células impidiendo el paso a la respuesta citotóxica [46]. La eficacia de una depleción de células reguladoras por anticuerpos anti-CD25, anti-CTLA-4 y anti-GITR [64] para el tratamiento de cánceres murinos abre perspectivas terapéuticas fascinantes. Protocolos similares, asociados o no a vacunación antitumoral, se encuentran en estudio en el humano, principalmente para el tratamiento del melanoma [65].

## 2.2 Células reguladoras y riñón

### 2.2.1 Afectación renal en el síndrome IPEX

Las nefropatías que aparecen en el curso del IPEX fueron descritas por R. Habib a inicios de los años 90 [66]. El síndrome se caracteriza sobre todo por la afectación digestiva, constante y reveladora de la mayoría de los casos, la enteropatía auto-inmune [67]. Solamente diez años más tarde la identificación de una mutación en el gen *Foxp3* en la forma severa ligada al X, la más frecuente, permite definir a un subgrupo de pacientes como afectados por el síndrome denominado IPEX [67]. La enteropatía auto-inmune se define por una enteritis difusa que afecta a intestino y colon, una resistencia a la dieta sin gluten y por la elevada incidencia de enfermedades auto-inmunes asociadas. La presencia de anticuerpos anti-enterocitos pone en relieve su naturaleza auto-inmune. La

afectación renal es frecuente pero por lo general infraestimada en el curso del IPEX, enmascarada por la severidad de la presentación [53]. Dos tipos de nefropatías, asociadas o no, se encuentran descritas: una nefritis tubulo-intersticial revelada por un síndrome de Fanconi, y una glomerulonefritis extramembranosa [66]. Cuando el suero se estudia en inmunofluorescencia indirecta respecto a cortes de riñón normal se encuentra siempre anticuerpos dirigidos contra células tubulares proximales y/o contra algún constituyente de la membrana basal tubular. La adsorción de suero respecto a cortes digestivos negativos y a veces la fluorescencia respecto al riñón sugieren que existe un determinante antigénico común. Algunos de estos antígenos, purificados en lisados de membrana basal tubular y células epiteliales (tubulares y villositarias) permiten el acceso al diagnóstico de estos desórdenes. Entre éstos se encuentran proteínas de 75 [68], 58 y 55 kDa. El auto-anticuerpo dirigido contra el antígeno AIE-75 es específico de las enteropatías auto-inmunes complicadas con afectación renal [68]. Esta proteína se encuentra presente predominantemente en células epiteliales de la luz digestiva y túbulos renales proximales.

La observación de una joven mujer, seguida por una insuficiencia renal asociada a un síndrome de Fanconi completo, permitió caracterizar al primer caso de déficit severo en células reguladoras *Foxp3*<sup>+</sup> no ligado a una mutación del gen *Foxp3* [69]. Procedente de una familia consanguínea, se la seguía a esta mujer desde la edad de los 10 años por un desorden inmunitario que asociaba infecciones recidivantes, síndrome poli-auto-inmune y pan-hipogammaglobulinemia. Revelada por una eritroblastopenia, la enfermedad se manifestó sucesivamente por gastritis, vitiligo, enteropatía auto-inmune, hepatitis y nefritis tubulo-intersticial. El auto-anticuerpo anti-AIE75 se encontraba presente, confirmando la reactividad del suero contra los bordes en cepillo de las células tubulares proximales y villositarias [69]. El parecido clínico con el síndrome IPEX ubicó a

las células reguladoras  $\text{Foxp3}^+$  en el centro de las investigaciones inmunológicas, que finalmente revelaron un déficit profundo del compartimento regulador  $\text{Foxp3}^+$ . Una improbable mutación del gen *Foxp3*, eventualmente revelada por una inactivación parcial del cromosoma X sano, se descartó formalmente por la secuenciación de las regiones codificantes y mediante análisis de ligamiento [69]. Esta observación, frente a la frecuente asociación nefropatía-enteropatía auto-inmune en el síndrome IPEX, no deja dudas sobre el papel fundamental que juegan las células reguladoras  $\text{Foxp3}^+$  en el control de la autorreactividad contra los epitelios villositario y tubular renal. Las excepcionales enteropatías auto-inmunes descritas en el adulto, están asociadas a timomas, tumor en que el contingente  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^{\text{high}}$  parece quedar desprovisto de sus propiedades supresoras [58]. Se puede especular que la asociación enteropatía-nefropatía auto-inmune guarda relación, sea cual sea el contexto clínico, con un déficit cuantitativo o funcional mayor de la población reguladora  $\text{Foxp3}^+$ .

## 2.2.2 Otras nefropatías

El papel de las células reguladoras  $\text{Foxp3}^+$  se ha estudiado poco en las nefropatías primarias y en las enfermedades sistémicas con afectación renal secundaria. Se sugiere que se encuentran disminuidas en el lupus activo, lo mismo que en los pacientes con crioglobulinemia mixta sintomática [70]. Los estudios, limitados a la sola estimación de la proporción de células  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^{\text{high}}$ , necesitan sin embargo ser confirmados por otros que procuren una estimación más cuantitativa de la población  $\text{Foxp3}^+$ . Curiosamente, el compartimento linfocitario  $\text{Foxp3}^+$  puede ser contradictoriamente normal en las vasculitis ANCA [71].

Las células reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> se encuentran implicadas en la remisión obtenida en la enfermedad de Goodpasture [72]. La depleción de las mismas anula su efecto frente a la intensa respuesta de clonas reactivas contra el antígeno  $\alpha$ 3(IV)NC1 en la fase aguda de la enfermedad. Por el contrario, un aumento de la respuesta supresora se produce en la fase de remisión. Este acercamiento aunque indirecto sugiere que las células reguladoras suprimen la respuesta inmune dirigida contra el antígeno  $\alpha$ 3(IV)NC1 en la fase de remisión [72]. Estas observaciones se refuerzan con la demostración del papel protector de las células reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Foxp3<sup>+</sup> en un modelo murino de glomerulonefritis por anticuerpos anti-MBG. Si éstas no previenen los depósitos inmunes, por lo menos reducen el infiltrado glomerular por células inflamatorias, tanto como la secreción local de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  [73].

## 2.3 Células reguladoras en trasplante renal

### 2.3.1 Modelos experimentales

Las células reguladoras Foxp3<sup>+</sup> han demostrado su capacidad para controlar la respuesta alo-inmune en diversos modelos de inducción de tolerancia en el ratón. En líneas generales, los protocolos utilizados se fundamentan en el bloqueo de una o varias moléculas de co-señal (CD2, CD3, CD4, CD40L), conjuntamente a la inyección de células del donante [74]. Este tratamiento se opone a la activación completa de células T alorreactivas nativas, lo que aventaja a las células reguladoras [75]. La obtención de un

estado de tolerancia alo-específico implica la aceptación sin necesidad de tratamiento de un segundo injerto del mismo donante, siendo rechazado el trasplante procedente de un tercero. Este tipo de tolerancia destaca por su carácter dominante es decir transferible a otro animal [74]. Dicho de otra manera, la transferencia de células reguladoras alo-específicas de un animal tolerante a un receptor "nativo" conferiría a este último el estado de tolerancia [74]. Si los resultados espectaculares obtenidos en el roedor no se han podido hasta ahora reproducir en el gran mamífero, ayudan a entender los mecanismos en juego.

- Este estado de tolerancia es alo-específico y preserva la respuesta inmune dirigida contra células tumorales y agentes infecciosos [76, 77].
- Las células reguladoras alo-específicas contribuyen a los fenómenos de tolerancia por contigüidad ("linked suppression"), lo que permite propagar este estado de tolerancia a otros antígenos a la vez que al antígeno tolerógeno primario, a condición que se expresen conjuntamente en la superficie de una misma célula presentadora de antígenos [78]. Dicho de otra manera, si una CPA expone un alo-antígeno A tolerógeno, específicamente reconocido por células reguladoras, al mismo tiempo que un alo-antígeno B, la tolerancia se puede extender a este último. Este fenómeno ha sido puesto en evidencia igualmente con células humanas in vitro [79].
- El reconocimiento de alo-antígenos por parte de células reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> se lleva a cabo principalmente por vía indirecta, es decir mediante la presentación de pépticos alogénicos en moléculas CMH de clase II del receptor [74].
- Las células reguladoras alo-específicas se encuentran en los ganglios de drenaje y en el interior del injerto [39, 42, 80, 81], donde expresan las moléculas CD25, GITR, y TGF- $\beta$  de membrana [42, 81]. La frecuencia de células reguladoras guarda

relación con el establecimiento de una tolerancia dominante [42, 81]. El direccionamiento de células reguladoras en ganglio e injerto depende respectivamente de los ejes quimiotácticos CCR7 / CCL19/21 [39] y CCR4 / CCL22 [42].

- Las células reguladoras inhiben la función citotóxica de las células efectoras CD8<sup>+</sup> alorreactivas, pero no son capaces de oponerse a su expansión [13].
- El efecto supresor de las células reguladoras en trasplante depende, según los modelos, de las moléculas CTLA-4, IL-10 [74] y TGF- $\beta$  [81].
- Las células reguladoras inhiben la respuesta alogénica de células T nativas, pero son poco o nada eficaces frente a células T memoria polarizadas Th1 [81].
- La participación de receptores Toll (4 y 9) expuestos por las células presentadoras de antígeno favorece el escape de células efectoras al efecto supresor de las células reguladoras. Los receptores Toll tienen por ligando antígenos exógenos, sobretudo microbianos [82-84]. Toll 4 reconoce los LPS bacterianos en tanto que Toll 9 responde a motivos CpG, presentes en las secuencias genómicas virales. Este mecanismo es necesario para el mantenimiento de la respuesta anti-infecciosa en el órgano tolerado. El corolario negativo sería el riesgo de ruptura de un estado de tolerancia dominante por una infección. Estos datos ponen en perspectiva la asociación clínica bastante conocida en trasplante renal entre infección por citomegalovirus (CMV) y rechazo agudo [85]. Una publicación demuestra que la participación directa del receptor Toll 8 anula la función de las células reguladoras [86].

## 2.3.2 Pruebas de la existencia de inmunotolerancia en trasplante renal

Las observaciones de tolerancia en trasplante renal con humanos son excepcionales pero existen. Se trata de pacientes en los que la interrupción del tratamiento inmunosupresor no tiene ninguna repercusión en la aceptación del injerto. Es probable que un estado de tolerancia resulte de la conjunción de diferentes mecanismos, factores de tolerancia recesiva (anergia, ignorancia, delección) o dominante (regulación). En el año 2000, Van Buskirk demostró un fenómeno de regulación inmunológica en cinco trasplantados renales y dos trasplantados hepáticos, de los que tres llegaron a prescindir de todo tratamiento inmunosupresor [87]. El sistema que recibió el nombre de hipersensibilidad retardada trans-vivo, se logró observar mediante la co-inyección en la pata de un ratón inmunodeprimido de células del receptor y antígenos del donante. La medida de la hinchazón de la pata permitió estimar de manera semicuantitativa la intensidad de la respuesta alógena. En estos siete pacientes, existía una supresión aló-específica en presentación indirecta, dependiente de TGF- $\beta$  [87].

Algunos años más tarde, dos grupos se interesaron por las células reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> en trasplantados renales. Estos estudios evaluaron indirectamente su efecto supresor sobre la secreción de IFN- $\gamma$  por parte de células T alo-específicas [88, 89]. El aumento de la secreción de IFN- $\gamma$  después de la depleción de células CD25<sup>high</sup> confirmó el efecto supresor de estas células sobre la respuesta alógena. Cuando ésta es explorada en presentación indirecta, un efecto supresor fue puesto en evidencia en 47% de aquellos con leve reactividad inicial frente al donante, contra 0% en los plenamente

reactivos [88]. En el otro estudio, basado en la medida de la respuesta alogénica por presentación directa, ningún efecto por parte de las células reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> se notó [89]. Este resultado muestra el papel de la presentación indirecta en la elaboración de la respuesta reguladora [90].

No hace mucho el equipo de W. Hancock describió una frecuencia elevada de células Foxp3<sup>+</sup> en los infiltrados "borderline" de evolución favorable. Las células Foxp3<sup>+</sup> estarían, en proporción, poco representadas en las biopsias de rechazo agudo [91]. La cuantificación del ARNm *Foxp3* en orina, reflejo de la población linfocitaria reguladora que infiltra el injerto renal, permitiría predecir la corticosensibilidad y la evolución de un rechazo agudo [92].

### **2.3.3 Límites de las estrategias de inducción de tolerancia en el ser humano**

El carácter excepcional de las observaciones de tolerancia a un injerto alogénico en trasplante renal en humanos contrasta con los resultados obtenidos en el ratón. Las explicaciones abundan, pero tres razones primordiales pueden discutirse. Primero, la frecuencia de células T memoria alorreactivas difiere; es elevada en el gran mamífero, pero muy limitada en los roedores criados en condiciones "specific pathogen free" [93]. Estas células resultan de una exposición anterior a un alo-antígeno dado pero sobre todo de la alorreactividad cruzada con células T específicas de otros antígenos. Su implicación en los rechazos agudo y crónico ha sido ampliamente demostrada en trasplante humano

[94]. La capacidad para evadir el efecto supresor de las células reguladoras [81], la mínima necesidad de co-señal para una activación completa [95], y la resistencia a la apoptosis son razones teóricas más que suficientes que hacen de las células T memoria un obstáculo al establecimiento de tolerancia [93, 96]. Además, parece que constituyen lo esencial de células T persistentes tras la depleción linfocitaria profunda inducida por anti-timoglobulina (ATG) o alemtuzumab [97], a pesar de las observaciones de Krystufkova que muestran que ATG puede promover la expansión de células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Foxp3<sup>+</sup> [98]. Segundo, las estrategias inmunosupresoras basadas en una inducción linfopeniante constituyen un obstáculo al establecimiento de tolerancia. En efecto, la linfopenia da lugar a una proliferación linfocitaria (proliferación homeostática), que genera sobre todo células memoria refractarias a la inducción de tolerancia [99]. Tercero, ciertos inmunosupresores pueden considerarse perjudiciales para la puesta en marcha de los mecanismos de tolerancia. Los inhibidores de la calcineurina (ICN) se oponen a la apoptosis post-activación de linfocitos alorreactivos [100]. Estos medicamentos son igualmente perjudiciales para la expansión de células reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Foxp3<sup>+</sup> [101]. Contrariamente, rapamicina aumenta la apoptosis post-activación y otorga ventaja a las células reguladoras Foxp3<sup>+</sup> sobre las células T nativas alorreactivas [100-102]. Cabe mencionar que la inducción con anticuerpos anti-CD25 (basiliximab) no parece incompatible con el establecimiento de una regulación dependiente de las células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> [88, 103].

### 2.3.4 Los progresos alcanzados

La elaboración de estrategias terapéuticas destinadas a inducir tolerancia en trasplante requiere de la mejora del seguimiento de la respuesta alogénica [104]. Se trata de conocer los alcances de las respuestas agresiva y reguladora, para llevar a cabo las modificaciones necesarias de la inmunosupresión. La evidencia de una regulación predominante llevaría a aligerar e incluso interrumpir el tratamiento. Los métodos basados en técnicas dilucionales complejas y que requieren de cálculos matemáticos elaborados, no se adaptan a la práctica clínica habitual [105]. La elaboración de otros métodos es por consiguiente necesaria. Combinando técnicas de ELISPOT y citometría pueden estudiarse las respuestas citotóxica [94] y reguladora [88, 106]. Además, se han visto claras posibilidades en el repertorio V $\beta$  de los linfocitos presentes en el injerto de animales tolerantes [107]. Los autores sugieren que la oligoclonalidad observada se explica por el reclutamiento de un número limitado de clonas reguladoras alo-específicas [107]. La posibilidad para identificar precozmente las clonas dominantes, citotóxicas o reguladoras, constituiría una herramienta valiosísima de seguimiento [108].

En 2006, el equipo de Liu encuentra que el receptor de IL-7 (CD127) se encuentra regulado a la baja en una subpoblación de células T CD4<sup>+</sup> circulantes, que la mayoría de estas células expresan Foxp3 (87%) y que distingue hasta un 10% de células T CD4<sup>+</sup> como células Treg potenciales. Proponen que la combinación de CD4, CD25 y CD127 es capaz de caracterizar a las células T reguladoras Foxp3<sup>+</sup> en los afectos de diabetes tipo 1 y consideran al CD127 como biomarcador de las células Treg humanas [109]. Estos resultados plantean sin embargo una serie de interrogantes. Primero, porque la mayoría de las células T CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> pueden no obedecer a la descripción típica de células Treg,

las exploraciones comúnmente utilizadas para el análisis funcional e inmunofenotípico pueden ser deficientes en cuanto a la identificación de un gran número de células Treg "putativas". Las implicancias son importantes respecto a la determinación de la existencia de diferencias cuantitativas en ciertas enfermedades. Segundo, el hecho de que las células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> CD127<sup>-</sup> puedan tener propiedades reguladoras pone en cuestión los estudios que sugieren que Foxp3 no es un "buen" marcador de la actividad linfocitaria T reguladora. En efecto, Foxp3 es un excelente marcador, lo es incluso para las subpoblaciones de Tregs adaptativas que aparecen tras la activación de linfocitos T normales por señales sub- o supra-óptimas de su TCR. Pero no todas las células T Foxp3<sup>+</sup> son necesariamente células Treg y su actividad depende del nivel de expresión del gen *Foxp3* y de las isoformas de la proteína expresada. Tercero, los esfuerzos para seleccionar las células Treg basados en la expresión de CD25 pueden llevar a infraestimar la presencia de células Treg que no expresan el receptor de interleuquina-2. Las células CD4<sup>+</sup> CD127<sup>low/-</sup> CD25<sup>-</sup> suprimen con bastante eficacia, aunque el porcentaje de células T reguladoras Foxp3<sup>+</sup> en esta subpoblación represente sólo el 25%. Las células T reguladoras no se resumen a una sola población. Ésta es extremadamente diversa [110]. Esta diversidad depende estrechamente de interacciones con el medio exterior y comensal, y evoluciona constantemente en el tiempo por estímulos ocasionales (contexto micro-ambiental inflamatorio). En este sentido, CD127 puede ser útil en la identificación de los diferentes subtipos de células Treg incluyendo las células Tr1 y Th3 relegando al CD25 cuya expresión no guarda relación con la de Foxp3 en las células CD4<sup>+</sup>. Por esta razón, comparado al marcaje intra-celular Foxp3 necesitando la permeabilización de las células, el marcaje de membrana parece prometedor por el reconocimiento sencillo de los marcadores específicos de las células Treg, si se busca su integración a la rutina.

El estudio de la "semiología" de la dinámica de las subpoblaciones linfocitarias reguladoras como medio para predecir la evolución del trasplante y los eventos clínicos negativos del postrasplante son tan importantes como el análisis fiable de estas subpoblaciones. No obstante, numerosas situaciones se conocen mal todavía y carecen de marcadores diagnósticos o pronósticos para un seguimiento de la capacidad supresora de los Tregs en la clínica [111-114].

Los protocolos de inducción de tolerancia deberían idealmente velar por la promoción de una respuesta reguladora in situ. La asociación de una proteína de fusión agonista de IL-2, de otra antagonista anti-IL-15, y de rapamicina ha dado excelentes resultados en el ratón [115]. La primera citoquina aumenta la apoptosis post-activación de células alorreactivas y estimula la expansión de células reguladoras; la segunda en combinación con rapamicina disminuye la resistencia a la apoptosis de células activadas [115]. La perfusión de IL-2, disminuyendo inmunosupresión, estimula considerablemente la expansión de células reguladoras Foxp3<sup>+</sup> [116]. Esta citoquina utilizada hasta ahora con una eficacia moderada en la estimulación de la respuesta antitumoral, podría encontrar una indicación en la inducción de tolerancia, combinada a rapamicina. Siendo realistas a corto plazo, otras moléculas se encuentran a disposición y son atractivas en trasplante. Destinadas idealmente a pacientes desprovistos de una respuesta T memoria alorreactiva en el momento del trasplante [94], las estrategias terapéuticas deberían evitar una inducción linfopeniante tanto como un tratamiento con inhibidores de la calcineurina. Un bloqueo de la co-señal con anticuerpos anti-CD40, y/o CTLA-4-Ig (belatacept) podría favorecer la respuesta reguladora bloqueando la efectora. El anticuerpo anti-CD3 humanizado no mitogénico, utilizado en la diabetes auto-inmune [117], es igualmente prometedor. Su eficacia promoviendo la respuesta reguladora se ha demostrado en el ratón in vivo [118] y en el humano in vitro [119]. Se ha publicado su utilización en el

trasplante de islotes en el humano, asociado a rapamicina [120]. En estos pacientes se ha observado un aumento de la subpoblación CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> [120].

## 2.4 Correlaciones clínicas

### 2.4.1 Rechazo agudo celular

El reclutamiento de células T que expresan Foxp3 (la mayoría verdaderos Tregs) en el injerto se ha descrito como parte de la respuesta inflamatoria alogénica [121]. Esta constatación lleva a sugerir que los Tregs participan en la modulación de la respuesta inmune contra el injerto. Sin embargo, los resultados de los estudios sobre la significación clínica y pronóstica de los infiltrados Foxp3<sup>+</sup> en el injerto renal con rechazo agudo son contradictorios.

En 2005, Muthukumar encontró niveles elevados de transcripción de Foxp3 y CD3 urinarios en pacientes habiendo desarrollado un rechazo agudo respecto a aquellos con nefropatía crónica del injerto o función renal estable [92]. Niveles bajos de ARNm *Foxp3* urinario en pacientes con rechazo agudo celular permitirían predecir una pobre respuesta a esteroides y un mayor riesgo de fracaso del trasplante en los siguientes 6 meses [92]. Otros estudios basados en el análisis de Foxp3 en de biopsias de injerto, por inmunohistoquímica (IHQ) o RT-PCR, confirmaron una elevada expresión de Foxp3 en los injertos con rechazo agudo celular, respecto a los injertos estables o con rechazo agudo

humoral [122, 123]. Estos resultados reflejaron la estrecha relación entre los infiltrados Foxp3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> [124] y CD4<sup>+</sup> [122]. No obstante, estos estudios no demostraron beneficio alguno de los infiltrados ricos en Foxp3<sup>+</sup> sobre el resultado del trasplante [122, 125] ni tampoco relación alguna entre el nivel de expresión de Foxp3 in situ e inflamación con daño (tubulitis) [123, 124, 126], agravación de las lesiones crónicas medidas por los scores [124] o con el acortamiento de la supervivencia de los injertos [123, 126].

El impacto de los infiltrados ricos en Tregs se ha estudiado también en la inflamación de bajo grado, incluyendo los cambios "borderline" [127-129] y rechazo agudo "subclínico" [127, 130, 131]. Estudios recientes han sostenido un efecto protector de las células Foxp3<sup>+</sup> infiltrando el injerto y relacionado inversamente con la inflamación intersticial [127]. Los ratios Foxp3 / granzyme B y Foxp3 / CD4 fueron más elevados en los cambios "borderline" que en rechazo agudo [127-129] o que en rechazo "subclínico" [127]. En los cambios "borderline" una fuerte expresión de ARNm *Foxp3* intra-injerto se ha asociado a estabilidad de las lesiones histológicas y evolución favorable al mes después de la biopsia [128]. Estos datos están a favor de argumentos que señalan una influencia favorable de las células Foxp3<sup>+</sup> en el curso del rechazo celular "subclínico", en el que aparecen en proporciones más importantes si se compara al rechazo agudo con pérdida acelerada de función del injerto [127, 130]. Un ratio Foxp3 / CD3 bajo en la biopsia sistemática a los 6 meses con rechazo celular "subclínico" se asocia con mala función del injerto a los 2, 3 y 5 años después del trasplante [130, 131]. En conjunto, el análisis de Foxp3 puede ser útil para distinguir entre células T "dañinas" e "inofensivas" en los infiltrados con inflamación limitada. Esto debe entenderse estrechamente unido a la cuestión técnica de si el test utilizado para el análisis de Foxp3 puede diferenciar entre expresión de Foxp3 específica de los Tregs y aquella producto de la activación esperable en los contextos de una importante inflamación del injerto.

## 2.4.2 Disfunción crónica del injerto

La información sobre el rechazo crónico es escasa y proviene principalmente de estudios sobre poblaciones de linfocitos T circulantes. Se ha mostrado que los pacientes trasplantados renales con rechazo crónico presentaban cifras más bajas de células reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> respecto a los pacientes con función del injerto estable [132, 133]. Se ha mostrado que los pacientes con rechazo crónico presentaban una frecuencia reducida de células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> y una expresión también reducida del ARNm *Foxp3* en las células CD4<sup>+</sup> respecto a los trasplantados renales estables o aquellos que presentan tolerancia operacional [132, 133]. Afirmar que las células reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Foxp3<sup>+</sup> de los pacientes con rechazo crónico presentan una capacidad supresora normal puede resultar controvertido. Para aclarar esta duda, el equipo de Braudeau diseñó un ensayo de supresión utilizando una estimulación con anticuerpos policlonales anti-CD3 autólogos [134]. Constataron que las células reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> circulantes de pacientes con rechazo crónico obtuvieron una supresión comparable a los controles y concluyeron que son plenamente funcionales [134]. Por otro lado, el equipo de Akl evaluó la capacidad supresora de las células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> circulantes por un ensayo con células T donante-específicas [133]. Separando magnéticamente la población CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> de las células T reactivas, aportaron pruebas de la existencia de una regulación donante-específica en trasplantados renales estables contrariamente a aquellos con rechazo crónico. Estos autores proponen que el déficit cuantitativo, pero no cualitativo, en Tregs puede favorecer el desarrollo de rechazo crónico [132-134]. Pero, una hipótesis alternativa, sin que se excluya ninguna de las dos, postula que un número reducido de Tregs circulantes en pacientes con rechazo crónico puede explicarse por una orientación y reclutamiento más selectivos de estas células en los injertos crónicamente inflamados

[126, 135], como se ha demostrado en otros contextos inflamatorios crónicos [62, 136]. Esta hipótesis puede explicar la ausencia de Tregs donante-específicos circulantes debido a su retención en los injertos con rechazo crónico [133, 134].

Una lenta evolución del rechazo crónico a mediación celular T se ha asociado a un reclutamiento significativamente más elevado de células Foxp3<sup>+</sup> en el injerto comparado al rechazo agudo celular [135]. La frecuencia más elevada de células Foxp3<sup>+</sup> se ha visto presente en los agregados nodulares más organizados, donde las células T cercan una zona central rica en células B, característica de la inflamación crónica [135, 137]. Este hecho corresponde con las observaciones que muestran que la expresión de Foxp3 intra-injerto guarda relación con el tiempo después del trasplante [126, 138]. Tres estudios independientes han corroborado esta frecuencia elevada de células Foxp3<sup>+</sup> infiltrando los injertos presentando rechazo crónico y abundante tejido cicatricial, con buenos resultados del trasplante [135, 139, 140].

Aunque los datos experimentales procedentes de modelos animales sostienen el rol esencial de las células Foxp3<sup>+</sup> en el control de la respuesta alo-inmune, las conclusiones de los estudios con humanos se perciben como discordantes y pueden llevar a confusión a los lectores no expertos. No obstante, conviene recordar que el método utilizado para el análisis de Foxp3 y los parámetros clínicos pueden influenciar considerablemente la interpretación de los resultados. La mayor parte de estos resultados contradictorios pueden atribuirse a factores metodológicos y/o pueden explicarse por el conocimiento que se tiene a día de hoy de la biología de los Tregs.

Dos enfoques diferentes han sido propuestos al respecto de la cuantificación de células Foxp3<sup>+</sup> en el injerto, independientemente del método utilizado (RT-PCR o IHQ).

De manera sencilla, la expresión de *Foxp3* fue normalizada, ya sea en todo el muestreo de tejido [92, 121-125, 141, 142] como en el compartimento linfocitario T que infiltra el injerto [127-130, 135]. En el primer enfoque, la expresión de *Foxp3* revela la amplitud del infiltrado inflamatorio más que la contribución del componente regulador a dicho infiltrado. Los estudios concluyeron que a mayor inflamación, mayor fue el nivel de expresión de *Foxp3* en el injerto [121, 123, 142]. Provocativamente, ciertos autores proponen inclusive que la expresión de *Foxp3* podría ser considerada como biomarcador instructivo de rechazo agudo [142]. El segundo enfoque toma en consideración el equilibrio entre los "brazos" efector y regulador de la respuesta alo-inmune. Los estudios concluyeron que la expresión elevada de *Foxp3* se relacionó positivamente con mejores resultados del trasplante [128-130, 135], inflamación de bajo grado [127] o hiporreactividad donante-específica [140]. La constatación de que la frecuencia de células *Foxp3*<sup>+</sup> es más baja en rechazo agudo comparado al rechazo crónico de lenta evolución, a pesar que en números absolutos parezca más alta, ilustra cómo estos dos enfoques pueden conducir a conclusiones opuestas (Figura 2A) [135]. De igual manera, el ratio *Foxp3* / ARNm granzima B es significativamente más elevado en las biopsias con cambios "borderline" respecto a las biopsias con rechazo agudo, a pesar que los niveles de *Foxp3* en números absolutos parezcan más bajos [129].

Curiosamente, el equipo de Bunnag encontró una pobre correspondencia entre el número de células *Foxp3*<sup>+</sup> en cortes de biopsias y la cuantificación de ARNm *Foxp3* [126]. Los autores atribuyeron esto principalmente a la repartición de los infiltrados y al número limitado de muestras apropiadas para el inmuno-marcaje. Sin embargo, esta pobre correspondencia puede igualmente explicarse por la poca sensibilidad de la técnica de IHQ, que identifica preferentemente las células que expresan fuertemente *Foxp3*. Como consta en la literatura las células *Foxp3*<sup>high</sup> se tratan de Tregs activadas [143, 144] y la

subpoblación  $Foxp3^{low}$  la constituyen células T efectoras activadas convencionales [127, 143-146]. Debe advertirse que la PCR es incapaz de estimar la fracción de células  $Foxp3^{high}$ . Los estudios con IHQ han constatado que la casi totalidad de células  $Foxp3^+$  de los infiltrados eran  $CD4^+$  [122, 123, 127, 130, 135]. Se plantea entonces la hipótesis de que la expresión de  $Foxp3$  inducida por activación implica a la vez células  $CD4^+$  y  $CD8^+$  [147], lo que sería otro argumento para sugerir que IHQ ignora las células T activadas convencionales que expresan  $Foxp3$ . En consecuencia, frente a una biopsia de rechazo en la que sin duda la mayoría de las células de los infiltrados son células T efectoras (Tefec), estimar la fracción de células que expresan fuertemente  $Foxp3$  toma mejor en consideración el equilibrio entre los componentes efector y regulador de la respuesta alo-inmune y puede ser más útil que simplemente cuantificar  $Foxp3$  por RT-PCR. Por último, esta pobre correspondencia entre el número de células  $Foxp3$  en cortes de biopsias y la cuantificación de ARNm *Foxp3* en injertos inflamados sugiere que el análisis de  $Foxp3$  utilizando RT-PCR debe interpretarse con prudencia [126].

Últimamente, la evaluación de los cambios epigenéticos del locus *Foxp3* se ha propuesto como la manera más fiable para cuantificar los Tregs 'bona fide' [148]. En efecto, una región preservada en la evolución en el interior del locus *Foxp3*, por encima del exón-1, se ha encontrado desmetilada en los nTregs, contrariamente a los iTregs y las células T activadas [31]. Al respecto, la evaluación cuantitativa de la región TSDR (en inglés, natural *Foxp3* Treg-specific demethylated region) se ha relacionado positivamente con los Tregs 'bona fide'  $CD127^-$   $CTLA-4^+$  en los trasplantados renales [149] y con las células  $Foxp3^+$  que infiltran los injertos con rechazo agudo "subclínico" [150]. Al respecto, Bestard no encontró relación entre IHQ y TSDR *Foxp3* respecto a la cuantificación de  $Foxp3$  intra-injerto en el rechazo agudo confirmado por biopsia [131]. Este resultado sugiere que las células T activadas pueden confundirse con Tregs en los contextos de

intensa inflamación, incluso utilizando IHQ, aunque esto depende del punto de corte para la técnica utilizada en cada centro. El enfoque epigenético se basa en suposiciones restrictivas en las que todos los Tregs circulantes y los que infiltran el injerto son de origen tímico, por lo que no se concibe evento alguno transcripcional/postranscripcional que afecte la secuencia entre apertura del locus *Foxp3* y la expresión de Foxp3. En cuanto a esto, Akimova ha demostrado recientemente que estas afirmaciones eran falsas en los receptores de órganos sólidos considerando la inmunosupresión que siguen [149]. Los iTregs, por ejemplo, generados por efecto de los inhibidores de mTOR (ImTOR), presentan un ratio Foxp3 / TSDR elevado mientras que con inhibidores de la calcineurina se atenúa la expresión de Foxp3 en los nTregs a pesar del TSDR de los mismos completamente desmetilado (Figura 2B) [149].

Las células T activadas no parecen interferir demasiado en la cuantificación de células T reguladoras Foxp3<sup>+</sup> que infiltran el injerto, siempre y cuando la determinación se haga por IHQ y en un injerto no muy inflamado. No obstante, la capacidad inconstante de la RT-PCR y la IHQ para distinguir entre expresión de Foxp3 específica de los Tregs y aquella inducida por activación constituye un gran problema frente a injertos que presentan una importante inflamación.

## 2.4.3 Impacto de los factores externos en la biología de los Tregs

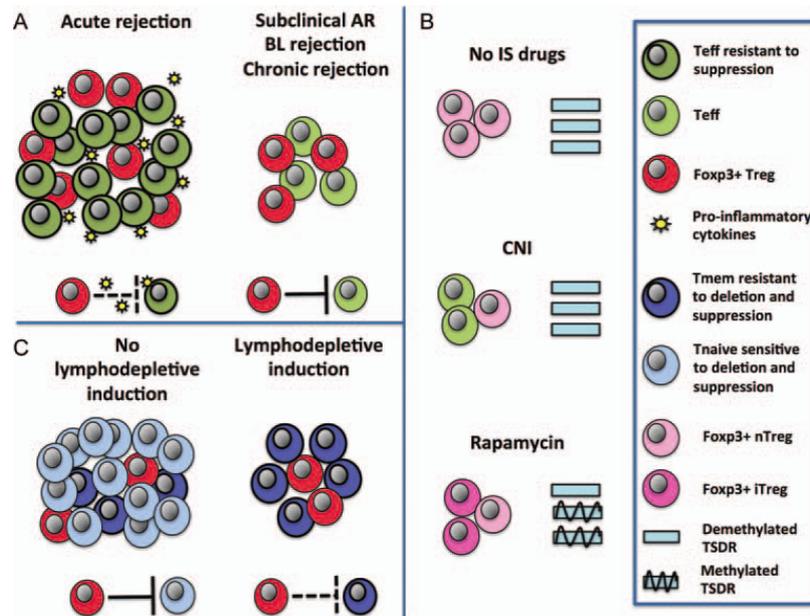
La comprensión de la biología de los Tregs ha mejorado de manera exponencial en los últimos años, principalmente por los estudios experimentales in vivo en el ratón. Los intercambios dinámicos de información entre científicos y clínicos han proporcionado pistas importantes para la interpretación del análisis de Foxp3 en los contextos clínicos más complejos. Sin embargo, la significación del análisis de Foxp3 en los receptores de órganos que deben recibir necesariamente una inmunosupresión ha planteado muchas preguntas importantes.

Primero, un aumento significativo de células Foxp3<sup>+</sup> en los injertos inflamados no implica necesariamente que la respuesta alo-inmune haya dado un giro hacia la tolerancia, por el contrario puede estar a favor de una respuesta inflamatoria que evoluciona hacia la cronicidad [62, 126, 135, 139]. Esto no significa que los Tregs sean incapaces para controlar la inflamación [62], sino por el contrario que el análisis de Foxp3 es insuficiente para medir la fuerza de la respuesta reguladora. Los modelos experimentales en el roedor proponen que el equilibrio de las señales, vía STAT3 y STAT5 respectivamente, integra la influencia del micro-ambiente en el destino de las células T, que basculan entre los Tregs y la línea Th17 [151]. La situación se complica aún más al constatar que un ambiente pro-inflamatorio no favorece la supresión [82]. El fracaso de los Tregs naturales para suprimir los Tefecs en los contextos inflamatorios queda claro en las afecciones auto-inmunes, subrayando que el control de la respuesta inmunitaria no depende sólo de la relación Tregs / Tefecs y que interviene el micro-ambiente local (Figura

2A) [56]. En este sentido, el estudio de la orientación de la respuesta alo-inmune en los órganos linfoides secundarios, como comúnmente se hace en los modelos experimentales, probablemente sería más informativo, aunque no pueda efectuarse en el humano por razones evidentes.

Segundo, a pesar de las observaciones de ciertos autores, una frecuencia elevada de células reguladoras Foxp3<sup>+</sup> tras una depleción linfocitaria T no es sinónimo de condición necesaria para el desarrollo de tolerancia. En los trasplantados renales que reciben una inducción con ATG o alemtuzumab se produce una depleción profunda de las células T nativas [97]. Las células T memoria que resistieron a la depleción comienzan a desarrollarse desde el primer mes (Figura 2C) [93, 152]. A la par, una salida tímica de Tregs se produce [153]. Las células Foxp3<sup>+</sup> circulantes que pueden observarse reflejan la mayor contribución de las subpoblaciones linfocitarias reguladoras al control del compartimento de células T memoria [143] y eventualmente a la modulación de la activación de linfocitos T [154] más que una expansión selectiva de Tregs [153]. Pruebas convincentes indican que la proliferación inducida por la linfopenia (proliferación homeostática) pone trabas al control efectivo de la respuesta inmune por los Tregs. Antes que todo, las células T memoria son mucho menos sensibles al efecto supresor de los Tregs que las células T nativas [81, 93]. La proliferación homeostática por si sola hace resistentes a las células efectoras a la inducción de tolerancia (Figura 2C) [99]. Conforme a esto, es lógico que la inducción con alemtuzumab seguida de una inmunosupresión primaria con sirólimus se asocie a una elevada tasa de rechazo agudo, a lo que se suma probablemente una pobre capacidad de los inhibidores de mTOR para controlar las células T efectoras/memoria [155, 156].

Figura 2.—Injerencia de las condiciones postrasplante en la biología y función de las Tregs.



(A) Si un aumento en el número absoluto de células Foxp3<sup>+</sup> que infiltran el injerto se ha observado en el rechazo agudo, la frecuencia de Tregs es más baja comparada con otras afecciones asociadas a inflamación leve. Además, los Tefecs son bastante menos sensibles a la supresión en presencia de citoquinas pro-inflamatorias, sobretudo de IL-6, IL-1 y TNF $\alpha$ . (B) El TSDR desmetilado se correlaciona con el fenotipo Treg ‘bona fide’. Sin embargo, el tratamiento inmunosupresor puede influenciar considerablemente el ratio Foxp3 / TSDR. El efecto negativo de los inhibidores de la calcineurina en la regulación transcripcional y postranscripcional del gen *Foxp3* puede manifestarse por un ratio Foxp3 / TSDR bajo. Por otra parte, rapamicina induce iTregs, que se caracterizan por su TSDR metilado, esto hace crecer el compartimento Foxp3<sup>+</sup> pero deja ver un contraste respecto a un número pequeño de células con TSDR desmetilado. (C) Los agentes linfopeniantes disminuyen brutalmente el número de células T nativas. Contrariamente, las células T memoria resistentes a la depleción se encuentran presentes desde el primer mes. La frecuencia de células Foxp3<sup>+</sup> circulantes observada en la linfopenia refleja la mayor contribución de estas células al control del compartimento de células T memoria. La proliferación inducida por la linfopenia (proliferación homeostática) otorga ventaja a las células T memoria resistentes al efecto supresor de los Tregs. **J. Zuber et al. 2013**

Muchos de los fármacos inmunosupresores que se utilizan en trasplante pueden tener efectos nefastos en la inducción y función de los Tregs mientras que otros por el contrario parecen favorecer estas células e incluso podrían tener un efecto benéfico. Los

anticalcineurínicos afectan negativamente a las células reguladoras por diferentes mecanismos, sobre todo por la reducción de la cooperación entre NFAT y los factores de transcripción de Foxp3 [157], por el bloqueo de la secreción de IL-2 [158] y por interferencia con miR-155 que refuerza la vía de señalización de IL-2 en los Tregs [33, 159]. Se plantea entonces la pregunta interesante de si una baja expresión de Foxp3 podría ser el signo de la toxicidad por anticalcineurínicos. En modelos animales y humanos, los inhibidores de la calcineurina inhiben la generación de Tregs y su capacidad supresora [149, 160-163], por lo que la limitación de la dosis y del tiempo de exposición a estos medicamentos puede ser esencial para los futuros protocolos de inducción de tolerancia. Contrariamente, rapamicina favorece probablemente la supervivencia y función de los Tregs [149, 161, 164] pero pruebas claras de un efecto benéfico de los inhibidores de mTOR se echan en falta en estudios llevados a cabo en el ser humano, debido a efectos ambivalentes pro-tolerancia y pro-inflamatorio [165].

El papel crucial de las células reguladoras Foxp3<sup>+</sup> en la tolerancia de los injertos se ha visto claramente en numerosos modelos animales. No obstante, delimitar este rol en trasplante con humanos no es fácil. Se ha intentado encontrar respuestas analizando la expresión de Foxp3 en los injertos renales. Pero los estudios son heterogéneos referente a sus aspectos clínicos y metodológicos, y arrojan en consecuencia resultados contradictorios. Intentando abrirse camino entre estos resultados discordantes, el análisis a profundidad de la literatura muestra que la expresión de Foxp3 guarda relación con un buen o mal mal pronóstico según la biopsia del injerto presente respectivamente un bajo o alto grado de inflamación. Es absolutamente necesario armonizar los métodos de análisis de Foxp3. No hay que olvidar que uno de los principales problemas al estudiar la expresión de Foxp3 en los contextos inflamatorios radica en que el gen *Foxp3* puede expresarse en las células T efectoras recientemente activadas, lo mismo que en los Tregs

'bona fide'. Además, las formas polarizadas de células T destacan por su plasticidad como no lo pensábamos, lo que resulta en la capacidad de los Tregs para poder reprogramarse en Tefecs y viceversa. Toda tentativa para predecir la evolución del trasplante en el momento del rechazo agudo fundamentada únicamente en el análisis de Foxp3 no es en consecuencia posible. Alternativamente, la exploración del componente regulador de la respuesta alo-inmune podría convertirse en un biomarcador diagnóstico y pronóstico muy útil para el seguimiento a largo plazo de los trasplantados. Son necesarias entonces las condiciones siguientes: primero, el análisis de Foxp3 no debe llevarse a cabo en los contextos de intensa inflamación; segundo, el ratio Tregs / Tefecs debe interpretarse con prudencia durante la inducción linfopeniante; tercero, la importancia del TSDR desmetilado debe ser repensada a la luz de los efectos de los fármacos inmunosupresores; cuarto, los componentes pro- y anti-inflamatorio de la respuesta alo-inmune deben seguirse; quinto, son necesarios más estudios que impliquen todos los aspectos sobre la biología de los Tregs, incluyendo las características fenotípicas, epigenéticas y funcionales de estas células.

#### **2.4.4 Infecciones, Tregs e inhibidores de mTOR**

La necesidad de una regulación negativa del eje PI3K / Akt / mTOR para el desarrollo de los Tregs se sostiene en un cierto número de estudios. La limitación de la actividad de Akt para el desarrollo de los Tregs, tras la retirada prematura de la señal del TCR [166], es necesaria para la adquisición de la firma transcripcional normal de célula reguladora, lo mismo que para inducir la expresión de Foxp3 [164, 166]. La ausencia de la proteína mTOR en células CD4<sup>+</sup> nativas maduras, en condiciones en las que

normalmente se inducen células T efectoras, produce ausencia de la línea Treg [167]. La ausencia de señales inflamatorias transducidas por el complejo mTOR hace hipersensibles a las células T a niveles basales de TGF- $\beta$  producidos por los Tregs, como sugiere la fosforilación constitutiva de Smad3. En caso contrario, la hiperactivación del eje Akt / mTOR anula la expresión de los genes conexos a TGF- $\beta$ , incluyendo al gen *Foxp3* [164] y altera la función del compartimento regulador [168]. Además, la fosforilación de Foxo1 y Foxo3 inducida por Akt impide que estos se ligan y activen la transcripción del locus *Foxp3*, lo que conduce a una disminución de la expresión de *Foxp3* [169]. En resumen, estos resultados sugieren que la vía PI3K / Akt / mTOR no es solamente dispensable sino que además antagoniza el desarrollo de las células reguladoras.

Estas observaciones contrastan con el papel que juegan las señales del TCR, de CD28 y de los receptores de interleuquina-2 (activadores conocidos de la vía PI3K / Akt) en la ontogenia de los Tregs. Esta paradoja ha sido aclarada en estudios recientes. Primero y antes que todo, la señal del receptor de interleuquina-2 se apoya principalmente en la vía Jak3 / STAT5 en los Tregs, las vías MAPK y PI3K / Akt están sobre todo implicadas en la activación de células T efectoras [170, 171]. En segundo lugar, STAT5 y *Foxp3* inducen la expresión de Pim-2, responsable de la absorción de nutrientes, del metabolismo y progresión del ciclo celular exclusivamente en los Tregs activados, la activación de Akt apenas se deja notar en estas células [172-174]. Tercero, la vía de NF $\kappa$ B, y no la vía PI3K / Akt, por debajo de la pareja TCR/CD28, es la principal implicada para el inicio de la diferenciación de las células Treg tímicas [169, 175, 176]. Estas conclusiones concuerdan perfectamente con el papel de la activación de NF $\kappa$ B - CD28 dependiente en el timo para el inicio del programa Treg, con apertura del locus *Foxp3* [32].

Estos datos confirman el paradigma actual de la regulación a la alza de Foxp3 en los Tregs, en un proceso de múltiples etapas exquisitamente regulado, con independencia del eje PI3K / Akt [174, 177].

Las observaciones antes mencionadas sugieren que los ImTOR, pero no los ICN, crearían las condiciones necesarias para la generación y expansión de Tregs Foxp3+. En efecto, sirólimus (rapamicina) y everólimus preservan la función y homeostasis de los Tregs in vitro [101, 178, 179] e in vivo [102]. Por otra parte, los Tregs son selectivamente resistentes a la apoptosis inducida por rapamicina debido a una regulación a la alza de genes anti-apoptóticos. Este hecho otorga ventaja a estas células en cuanto a supervivencia respecto a las células efectoras expuestas a rapamicina [180]. La capacidad de sirólimus para restaurar la homeostasis inmunitaria en el ratón Fas-deficiente [181] y en humanos [182] da muestras de estos efectos pro-apoptóticos clínicamente relevantes de los ImTOR sobre las células efectoras.

En consecuencia, la administración prolongada in vivo de sirólimus a trasplantados renales conduce a un enriquecimiento del compartimento celular T CD4+ en Tregs Foxp3+ [140, 183]. El hecho de que los Tregs cuenten por una hiporreactividad linfocitaria donante-específica in vitro con sirólimus – pero no ciclosporina – demuestra una vez más la capacidad de expansión de Tregs alo-específicos sólo con inhibidores de mTOR [184].

Las propiedades experimentales de los ImTOR hacen concebir la esperanza de su empleo en la inducción de tolerancia, pero las tentativas para traducir los resultados prometedores de los estudios experimentales en el roedor han fracasado y el entusiasmo precoz no se ha podido mantener. Los esquemas que comportan una inmunosupresión primaria con sirólimus sólo, sin inhibidores de la calcineurina, siguiendo a una inducción

linfopeniante con alemtuzumab, se asocian a una incidencia de rechazo agudo de cerca del 30% [156, 185]. Conviene recordar que estos resultados contrastan fuertemente con el enriquecimiento significativo en Tregs Foxp3<sup>+</sup> circulantes observado al año postrasplante [186]. Este resultado algo inesperado sigue sin embargo la línea de otros estudios que demuestran la ausencia de relación entre frecuencia de células Foxp3<sup>+</sup> en sangre y protección contra la inflamación del injerto en pacientes tratados con sirólimus [183, 187]. Además, Brouard recientemente ha mostrado que los receptores de un trasplante de hígado recibiendo sirólimus en monoterapia mostraban un perfil transcriptómico pro-inflamatorio concomitante a una expansión tanto de células T memoria como de células T reguladoras en sangre [183]. En resumen, estos datos sugieren que la prolongada administración de sirólimus en humanos puede generar una respuesta inflamatoria dañina que puede atenuar o incluso contrarrestar el beneficio de la expansión de los Tregs.

Los mecanismos por los cuales el efecto tolerógeno de los ImTOR puede antagonizarse in vivo comprenden factores intrínsecos y extrínsecos a los Tregs. A la vista de los efectos ambivalentes de los ImTOR sobre los Tregs varias preocupaciones deben abordarse. Primero, una proliferación mantenida de Tregs puede exigir la re-expresión de mTOR, a menos que una cantidad en exceso de IL-2 sea provista [188]. Segundo, un cierto nivel de actividad de PI3K se necesita en los Tregs maduros para que puedan exhibir una función supresora plena, a sabiendas que esta vía es dispensable para la ontogenia de las células reguladoras [189]. En efecto, con una forma inactiva de PI3K, los Tregs pierden enormemente sus capacidades supresoras, en parte debido a un defecto en la expresión de ecto-enzimas inmunosupresoras por estas células [190]. Aparte, el grupo de Rudensky ha demostrado elegantemente que los Tregs debían lanzar el programa de polarización de los Tefecs mediante la expresión del factor de transcripción específico de la línea helper respectiva, para migrar de manera óptima hacia los tejidos y

ser plenamente funcionales [191]. Por ejemplo, la expresión del factor de transcripción STAT3 que induce células Th17 es obligatoria para el control de la patología dependiente de los Th17. La inhibición prolongada de mTOR puede alterar la capacidad de los Tregs para adquirir una función supresora óptima T-helper específica [167]. Tercero, rapamicina y sus análogos se unen ante todo a mTORC1, mientras que preservan la función de mTORC2 [192]. Debe señalarse que el bloqueo por los inhibidores de mTOR de la vía auto-inhibitoria S6K1 - mTORC1 dependiente activa Akt y mTORC2 [192]. La activación excesiva de Akt puede desestabilizar el fenotipo Treg regulando negativamente los factores de transcripción Foxo1 y Foxo3 [169]. La activación del eje mTORC2 / PKC $\theta$ , crucial para la diferenciación en Th2, pero no en Th1 ni en Th17, puede desviar la respuesta inmune hacia la polarización Th2 [193]. Consecuentemente, las células T en presencia de rapamicina son células polarizadas Th2 [194]. En efecto, más de 50% de los Tregs humanos altamente purificados, separados y cultivados en presencia de rapamicina, secretan IL-4 después de la cuarta re-estimulación [194].

Los inhibidores de mTOR pueden favorecer paradójicamente la inflamación y perturbar el proceso tolerógeno por vías ajenas a los Tregs [195, 196]. Estudios recientes han demostrado la capacidad de los inhibidores de mTOR para acrecentar la generación de células T memoria CD8<sup>+</sup> [193, 195]. Un estudio reciente ha mostrado que rapamicina no aumentaba las células T memoria CD8<sup>+</sup> que responden contra antígenos del injerto, sino aquellas que responden contra antígenos patógenos, lo que debe interpretarse con cautela [195, 197]. En efecto, la reactividad cruzada con moléculas de alo-antígenos leucocitarios humanos puede afectar hasta el 45% de células T memoria específicas de virus [198]. Además, un aumento significativo de células T memoria se ha observado en los trasplantados hepáticos tratados con sirólimus en monoterapia [183]. Por último, estudios recientes han aclarado los mecanismos por medio de los cuales la combinación

de una inducción linfopeniante con una inmunosupresión primaria con un ImTOR se asocia a un gran riesgo de rechazo [156, 185]. En efecto, la proliferación inducida por la linfopenia genera células T memoria, un fenómeno que refuerzan los ImTOR [199], sobre todo porque la expansión de células T memoria alorreactivas es resistente al efecto inmunosupresor de los ImTOR [200] y a la inducción de tolerancia [99].

Contribuyen también al efecto pro-inflamatorio de los inhibidores de mTOR la capacidad de estos medicamentos para aumentar la producción de IL-12, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-23 por parte de células dendríticas y monocitos, estimulados por productos patógenos [174, 196, 201]. Estudios recientes han mostrado de que los monocitos de pacientes trasplantados renales que recibían sirólimus presentaban un alto perfil pro-inflamatorio frente a LPS comparado a los que recibían anticalcineurínicos [201, 202]. Una estimulación de la respuesta innata, que implica células mieloides, se ha pensado para explicar los desórdenes inflamatorios observados bajo tratamiento con inhibidores de mTOR, la fiebre de origen desconocido o la neumonitis son algunos ejemplos. Esto concuerda con lo observado en la clínica donde la neumonitis asociada a los ImTOR puede producirse en ciertos casos por una infección viral o bacteriana auténtica, y su progresión agravada y prolongada por la exposición a los ImTOR [165]. Aunque sea esperable una frecuencia elevada de células T reguladoras en los trasplantados infectados que siguen una inmunosupresión con un ImTOR, esta elevada frecuencia puede estar asociada a un curso más difícil de la infección [114].

Además, se encuentran a favor de estos efectos pro-inflamatorios la firma transcripótómica pro-inflamatoria NF $\kappa$ B dependiente encontrada en los trasplantados renales tratados con sirólimus [183]. Los efectos pro-inflamatorios de los ImTOR implican una exposición de los pacientes tratados con estos fármacos a agentes patógenos,

responsables del aumento de linfocitos T memoria y de la respuesta inmunitaria innata. El amplio espectro de especies microbianas en el ambiente de los grandes mamíferos, comparado al de animales consanguíneos criados en condiciones "specific pathogen free", puede también explicar la resistencia del ser humano, contrariamente a lo que pasa con el ratón, a las propiedades tolerógenas de los ImTOR.

## **2.4.5 Cánceres y tolerancia**

Los fármacos inmunosupresores son cada vez más potentes, lo que se traduce en menos episodios de rechazo agudo y en una mejora de la supervivencia del injerto al año postrasplante [203]. Al mismo tiempo, se ha visto un aumento de la incidencia de malignidad (sobre todo para los cánceres viro-inducidos) [204, 205] y de la prevalencia de la misma que es 4-6 veces más elevada en los receptores de un trasplante de órganos respecto a la población general [206, 207]. Los receptores de órganos presentan 200 veces más riesgo de Carcinoma Epidermoide Cutáneo (CEC), mucho más que los pacientes que siguen una corticoterapia crónica o los afectados de Artritis Reumatoide en tratamiento de fondo, que presentan 2-4 veces más riesgo de CEC respecto a la población general [209, 210]. La edad en el momento del trasplante, la duración y la dosis de la inmunosupresión son los principales determinantes para el desarrollo de un CEC [212, 213]. La dosis de la inmunosupresión es el mayor determinante para el riesgo de metástasis, cuya incidencia es de 1-4% [211, 214]. Por último, los antecedentes de cáncer epidermoide de la piel son el mayor determinante de la recidiva [215].

Los CEC parecen escapar a la respuesta citotóxica, al menos en parte por la regulación a la baja de la E-selectina vascular y por el reclutamiento preferente de células T reguladoras [112]. Además, se ha descrito que estos tumores contenían menos células T CD8<sup>+</sup> CLA<sup>+</sup>, esenciales para la vigilancia inmunitaria eficaz de la piel. Como lo demostró Clark [112], los CEC tratados antes de la excisión con imiquimod, un agonista del receptor Toll 7, mostraron inducción de E-selectine en los vasos tumorales, reclutamiento de células T CLA<sup>+</sup> y regresión histológica del tumor.

Las pruebas de laboratorio para predecir el curso que seguirá un CEC en el trasplantado renal no se encuentran todavía disponibles. La caracterización de las subpoblaciones linfocitarias T reguladoras puede ser de utilidad para predecir el riesgo de CEC y de otros tumores en el postrasplante [111]. Carroll [113] emitió la hipótesis de que el aumento en el número de Tregs se asociaba al desarrollo de CEC en los receptores de un trasplante renal. Analizó el fenotipo de células mononucleares de sangre periférica de trasplantados renales con y sin CEC. Se conformaron dos grupos de acuerdo a edad, sexo y tratamiento inmunosupresor. A los pacientes se les siguió durante una media de 340 días para identificar los marcadores que podrían predecir estos tumores. Como lo explicó Carroll, respecto al nivel encontrado en los pacientes sin CEC, el número de células CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> y CD4<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup> CD69<sup>-</sup> Foxp3<sup>+</sup> aumentaba en los pacientes con CEC y puede ser predictivo de malos resultados en distintos tipos de cáncer. Un número elevado de células CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> y bajo de células Natural Killer (NK) puede predecir un alto riesgo de recidiva. Un ratio CD8 / Foxp3 bajo en las piezas de exéresis de tumores se asocia a la recidiva. Este estudio es el primero en demostrar un vínculo entre el fenotipo Treg y el riesgo de recidiva de cáncer en los pacientes trasplantados. Queda pendiente saber si estas conclusiones son aplicables bajo la influencia de la inmunosupresión y en el contexto de una exposición a niveles elevados de radiación ultravioleta.

Se encuentra cada vez está más claro el papel activo e importante que juegan las células T reguladoras en la progresión del cáncer, lo mismo que su función supresora de la inmunidad frente a los tumores [15, 41, 46]. Existe una justificación clara para la elaboración de estrategias en la clínica destinadas a disminuir las influencias reguladoras de éstas con el objetivo de aumentar la inmunidad antitumoral [64-65, 216]. La manipulación terapéutica de los Tregs forma parte de las nuevas estrategias para el tratamiento del cáncer. El análisis de la cantidad de estudios publicados demuestra que los Tregs se encuentran aumentados en los pacientes afectos de tumores malignos, y que la restauración de la inmunidad antitumoral en el ratón y el humano se produce después de su depleción, bloqueo del tráfico en los tumores o reducción de la diferenciación de éstas con inhibición de sus mecanismos de represión [216]. Además, estas células tienen un valor pronóstico en la progresión tumoral lo que justifica las estrategias de vacunación antitumoral e inmunoterapia dirigida con ayuda de medicamentos y microARN.

## **2.4.6 Aterosclerosis e inmunotolerancia**

La enfermedad cardiovascular representa la primera causa de morbilidad en el postrasplante renal, la principal causa de muerte y la segunda causa de pérdida del injerto. La enfermedad coronaria es la más frecuente de las afecciones ateromatosas. Un mejor conocimiento de los factores de riesgo, sobre todo de aquellos específicos del trasplante, un despistaje eficaz y un tratamiento global podrían disminuir la incidencia de esta complicación frecuente y grave [217].

La prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular tradicionales es muy elevada después del trasplante renal y la contribución de los tratamientos inmunosupresores a estos factores de riesgo a tenerse seriamente en consideración. La hipertensión arterial afecta al 80% de los pacientes que reciben anticalcineurínicos y aumenta el riesgo de eventos cardiovasculares mayores. La dislipemia es igualmente frecuente. Los esteroides, los anticalcineurínicos y sobre todo los inhibidores de mTOR son responsables de alteraciones lipídicas en ocasiones marcadas. Estudios de cohortes han mostrado que una elevación del LDL-colesterol y de los triglicéridos eran factores de riesgo para complicaciones ateromatosas. La diabetes, que sobreviene antes o después del trasplante, afecta del 10% al 25% de los pacientes según las series. Existen pocos estudios disponibles sobre la prevalencia de la hipertrofia ventricular izquierda, pero parece que su impacto en el desarrollo de eventos cardiovasculares es similar al observado en la población general.

Muchos otros factores de riesgo que los identificados en los primeros estudios de Framingham condicionan el riesgo cardiovascular. Una hiper-homocisteinemia se ha encontrado en el 70% de los trasplantados renales. Numerosos estudios han mostrado que ésta participaba del aumento de la incidencia de eventos coronarios y aumentaba el riesgo de muerte. La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria y bastantes estudios han mostrado que la elevación de la Proteína-C reactiva (PCR) era un factor de riesgo independiente de complicaciones coronarias en la población general, en los dializados y en los pacientes trasplantados. Ducloux [217] emitió la hipótesis de que la linfopenia CD4 correspondía a una ausencia de expansión Th2, Th3 o Tr1 en la reconstitución que sigue a la deplección linfocitaria inducida por ATG, ahí la pérdida del efecto anti-inflamatorio anti-aterógeno. Las poblaciones linfocitarias fueron evaluadas prospectivamente en 166 pacientes habiendo recibido ATG y 42 pacientes habiendo recibido un anticuerpo

monoclonal anti-CD25 no depletante. Si observo una expansión de linfocitos CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> en algunos pacientes habiendo recibido ATG y habiendo tenido una reconstitución rápida. Por otro lado, se mostró que la existencia de una linfopenia CD4 un año después del trasplante era un factor de riesgo independiente para la aparición de eventos ateromatosos y muerte. Ducloux comparo igualmente la producción linfocitaria de IL-10 y de IFN- $\gamma$  en respuesta a antígenos del CMV en pacientes sin y con antecedentes coronarios. Si la producción de IFN- $\gamma$  fue idéntica en los dos grupos, los pacientes que presentaban antecedentes coronarios tenían una muy baja producción de IL-10. Estos resultados sigue la línea de otros que sugieren que la incapacidad para generar una respuesta anti-inflamatoria es crucial para el desarrollo de aterosclerosis en esta población [217, 218, 219].

La inmunidad innata juega también un rol importante en la aterogénesis. Se ha mostrado que los trasplantados presentando un polimorfismo del receptor Toll 4 tenían un riesgo reducido de eventos coronarios [220] confirmando el rol de la inmunidad innata en la aterosclerosis postrasplante. Par otro lado, se ha observado que las células NKT aceleraban la aterosclerosis tras reconocer antígenos lipídicos presentados por moléculas CD1 [221].

Estos datos sugieren que el estatus inmunológico de los pacientes trasplantados influencia el desarrollo de lesiones ateromatosas y que ciertos tratamientos inmunosupresores pueden también influenciar directamente el desarrollo de complicaciones cardiovasculares.

## 2.5 Necesidad de seguimiento inmunológico del paciente trasplantado

### 2.5.1 Implementación del inmunocontrol

El seguimiento del estatus inmunológico de los pacientes trasplantados y la predicción, a corto plazo, de la supervivencia del injerto a largo plazo solo podrá efectuarse con la ayuda de marcadores poco o nada invasivos, utilizables en la práctica clínica habitual y, sobre todo, validados de manera adecuada por estudios prospectivos. El conteo de las subpoblaciones linfocitarias reguladoras en sangre periférica se recomienda con vistas al desarrollo de estrategias de inmuno-vigilancia en trasplante [222]. La puesta en evidencia de que el triple marcaje de membrana CD4/CD25/CD127 permite caracterizar las células T reguladoras Foxp3<sup>+</sup> (nTregs e iTregs conjuntamente) [109, 110] autoriza teóricamente el seguimiento rutinario del conjunto de Tregs de los pacientes trasplantados. La cuantificación del conjunto circulante de células T reguladoras por citometría de flujo permite estratificar a los pacientes trasplantados renales y predecir la evolución del trasplante en términos de supervivencia o de función del injerto (creatinemia y/o aclaramiento de creatinina) o por el riesgo de complicaciones asociadas a la inmunosupresión [222]. En 2012, Lin [223] postuló la hipótesis de que la respuesta inmune global de las células CD4<sup>+</sup> activadas (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) dependía del equilibrio o la proporción entre las células T circulantes que expresan Foxp3 y aquellas que no lo expresan. Analizó el fenotipo de células mononucleares de sangre periférica de 95

trasplantados renales, 17 insuficientes renales en estadio terminal y 18 controles sanos. El porcentaje global de células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> fue relevante biológicamente y guardaba relación con la tasa de Filtrado Glomerular (FG) medido por MDRD-4 [223]. Las células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> se encontraban disminuidas en los trasplantados renales comparado a los insuficientes renales en estadio terminal y los controles sanos, sugiriendo una influencia importante de la inmunosupresión crónica. Los trasplantados e insuficientes renales terminales conjuntamente mostraban sin embargo una proporción elevada de células T Foxp3<sup>+</sup> entre las células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> contrariamente a los sujetos normales, explicándose en parte por la disregulación inmunitaria y la susceptibilidad a las infecciones características de la Enfermedad Renal Crónica (ERC) [224, 225]. No encontró relación entre el número de células T reguladoras Foxp3<sup>+</sup> y el tiempo postrasplante, a pesar de las observaciones de otros equipos [103, 226, 227]. Curiosamente, mostró una asociación entre células Treg y malignidad postrasplante (la mayoría carcinomas cutáneos no melanoma).

Actualmente en trasplante, el tratamiento de inducción con un anticuerpo monoclonal dirigido contra la cadena alfa del receptor de interleuquina-2 (CD25) es frecuente. Abadja [103] emitió la hipótesis de que la utilización de este anticuerpo puede dificultar la identificación de las poblaciones de linfocitos T activados CD25<sup>+</sup>. Mostró de que el seguimiento del conjunto circulante de Tregs por citometría de flujo con la ayuda del triple marcaje de membrana CD4/CD25/CD127 era posible en los pacientes trasplantados renales incluso precozmente después de la inducción con anti-CD25, pero a condición de seleccionar las clonas dirigidas contra los epítopes no camuflados por el basiliximab o daclizumab.

Las correlaciones clínicas de la dinámica de los Tregs mejoran el seguimiento del conteo del conjunto circulante de estas células y permiten el desarrollo de un inmunocontrol en trasplante renal [222]. La Medicina Basada en la Evidencia permite la aplicación de los resultados de la evaluación de todas las correlaciones clínicas encontradas según su nivel de evidencia; la creación de scores pronósticos o de riesgo que permitan cuantificar el impacto del establecimiento de una regulación dependiente de las células Treg es el objetivo que se busca. La ventaja es un análisis fino y riguroso de las modificaciones terapéuticas para llegar a ajustes terapéuticos precisos con el fin de predecir y si fuera posible prevenir los eventos clínicos negativos del postrasplante (rechazo agudo, nefropatía crónica del injerto, etc), así como las consecuencias de una intensa inmunosupresión; todas capaces de influenciar la supervivencia de trasplante y trasplantado. La validación de estos scores sin embargo en cohortes significativas de pacientes es indispensable.

La creación del Score de Tolerancia Inmunológica Clínica (STIC) [222] es el fruto de un largo trabajo pilotado por Julien Zuber, Nefrólogo del Trasplante del Hospital Necker de Paris, que reúne nefrólogos e inmunólogos de las ciudades francesas de Tours y Saint-Étienne, de Bruselas (Bélgica), de Lausana y Ginebra (Suiza), y Valladolid. Este score pronóstico o de riesgo integra y busca la aplicación de todos los correlatos clínicos de los Tregs de los que se tiene conocimiento, de acuerdo a su nivel de evidencia, y es el primero que tiente el desarrollo de una estrategia de inmuno-vigilancia en la clínica.

- Una frecuencia de células T reguladoras "favorable" obtenida por citometría de flujo (permitidos los marcajes de membrana) es la prueba irrefutable de un estado de tolerancia "aceptable" [109, 110]. El ratio Tregs / Tefecs debe considerarse a título

orientativo, sobre todo en los contextos de intensa inflamación y bajo la influencia de la inmunosupresión [228].

- La existencia de un cáncer, especialmente los cánceres cutáneos no melanoma, se asocian a altos porcentajes de Tregs atestiguando por una respuesta reguladora exagerada que hace temer la recidiva [111-113].
- Concerniendo a las enfermedades infecciosas, aunque éstas puedan agravarse bajo el tratamiento con inhibidores de mTOR, una respuesta tolerógena exagerada es también responsable de su progresión [165]. Una consecuencia inevitable de una infección es la ruptura de un estado de tolerancia dominante [228].
- Los esquemas comportando una minimización de anticalcineurínicos con inhibidores de mTOR [229-231], inicio de novo con inhibidores de mTOR reforzados con micofenolato mofetil (MMF) sin inhibidores de la calcineurina [232], conversión de anticalcineurínicos a inhibidores de mTOR después del primer año postrasplante [233], y conversión precoz a inhibidores de mTOR después de una fase inicial con anticalcineurínicos [234-236], permiten una inmunosupresión eficaz (sinergia) evitando la nefrotoxicidad, se asocian a una mejor función renal con menos hipertensión arterial, son más seguros frente a los cánceres e infecciones oportunistas, y están a favor de una respuesta tolerógena suficiente.
- Un tratamiento de inducción con basiliximab o daclizumab se recomienda, en lugar de ATG o alemtuzumab, en los objetivos de favorecer la respuesta reguladora [228].
- La constatación del efecto anti-tolerancia de los anticalcineurínicos no se ha traducido en una contraindicación clara y fehaciente para la utilización de estos medicamentos que constituyen aún la piedra angular del tratamiento inmunosupresor.

- Las células T reguladoras Foxp3<sup>+</sup> están relacionadas positivamente con el filtrado glomerular [223]. Éstas se encuentran significativamente menos representadas a distancia del trasplante, en relación con la evolución funcional del injerto. Una caída significativa del número de células reguladoras está documentada desde 6-8 semanas después del trasplante y permanece en niveles bajos hasta los 6-8 meses postrasplante [226, 227].
- Tiempo sospechada, ahora se acepta que la microalbuminuria puede predecir la pérdida del injerto renal [237]. La microalbuminuria es habitualmente el reflejo de la degradación progresiva de la función del injerto [238] y del mantenimiento de un estado pro-inflamatorio [224, 225]. Ésta de ser considerada como un factor anti-tolerancia.
- Además de las modificaciones de la inmunosupresión hacia los esquemas llamados no nefrotóxicos [229-236], el tratamiento de los factores no inmunológicos (protección nefrónica) debe también considerarse. Por lo tanto, el control de la hipertensión [239, 240], el tratamiento con estatinas [241, 242] y la corrección de la anemia con Agentes Estimulantes de la Eritropoyesis (AEE) [243, 244] deberían ser considerados como promotores de tolerancia pues se oponen a las consecuencias deletéreas de un estado pro-inflamatorio persistente. Recientemente se ha mostrado que el tratamiento del hiperparatiroidismo secundario con paricalcitol conllevó efectos anti-inflamatorios importantes comparado a calcitriol in vitro e in vivo [245], pudiendo favorecer una respuesta tolerógena. La progresión de una aterosclerosis conocida, los marcadores analíticos de inflamación y los antecedentes de rechazo estarían también a favor de un estado pro-inflamatorio y anti-tolerancia.

El Score de Tolerancia a Inmunológica Clínica (ver Anexo 1) se compone de 6 ítems ponderados, que se puntúan de manera dicotómica (si o no). El peso de cada uno de los correlatos clínicos de los Tregs en cada uno de los ítems se establece por su nivel de evidencia y sus puntajes se expresan en números absolutos (de 0 a 24). Se fija en 18 puntos el umbral para dar el calificativo de "tolerante" o "no tolerante". Un porcentaje de Tregs "favorable", definido por un valor mayor o igual al fijado por el laboratorio como el límite inferior, suma 12 puntos a efectos de la puntuación (Ia). Presentar una neoplasia o desarrollar una infección suma 6 puntos (IIa). Los esquemas no nefrotóxicos o la inducción no linfodepletante con un anti-CD25 suma 6 puntos más (IIb). La baja del FG sustrae 3 puntos y la microalbuminuria sustrae 3 puntos más (IIb). El tratamiento con anticalcineurínicos sustrae 1 punto (III), lo mismo que todos los signos clínicos o biológicos que atestiguan por un estado pro-inflamatorio tales como la anemia, el hiperparatiroidismo secundario, el empeoramiento de una aterosclerosis preexistente, los marcadores analíticos de inflamación, etc (III). Finalmente, el antecedente de rechazo sustrae 1 punto más (III).

Los progresos alcanzados en trasplante en los últimos 20 años han permitido disminuir significativamente la incidencia de rechazo agudo. Sin embargo, la pérdida de función del injerto a largo plazo es todavía muy elevada lo mismo que la morbilidad y mortalidad asociadas al empleo crónico de una intensa inmunosupresión. El hecho de presentar un rechazo agudo representa un factor de riesgo importante de pérdida del injerto renal, por rechazo incontrolable o ulteriormente por disfunción crónica del injerto, por lo que todas las tentativas para prevenir la sobrevenida de un tal evento se encuentran justificadas. La estrecha colaboración entre los clínicos del trasplante y los inmunólogos permitirá el desarrollo de un inmunocontrol del trasplantado renal en los

objetivos de prevenir los episodios de rechazo, así como para detectar, predecir e inducir una tolerancia al trasplante [246-249].

# **3. Hipótesis y objetivos**



# 3. Hipótesis y objetivos

## 3.1 Hipótesis de trabajo

El seguimiento del inmunofenotipo Treg, sumado al entendimiento del impacto de las correlaciones clínicas de la dinámica de la población linfocitaria reguladora, permiten ajustes de la inmunosupresión más precisos que los obtenidos por el seguimiento convencional, lo que puede traducirse en menores tasas de rechazo, cánceres, infecciones, toxicidad de la inmunosupresión y complicaciones cardiovasculares.

## 3.2 Objetivo principal

Seguimiento del inmunofenotipo Treg, de la dinámica de la población linfocitaria reguladora y de sus correlaciones clínicas, que permitan desarrollar un inmunocontrol del trasplantado renal.

## 3.3 Objetivos secundarios

- (1) Valorar la factibilidad del triple marcaje de membrana CD4/CD25/CD127 para la identificación de las células T reguladoras.
- (2) Fijar los umbrales de normalidad para células reguladoras de acuerdo al monoclonal y citómetro utilizados y si existen diferencias de los mismos entre la población trasplantada y la población sana
- (3) Evaluar las diferencias entre la terapia con anticalcineurínicos e inhibidores de mTOR respecto a los valores de células Treg y el desarrollo de tolerancia.
- (4) Verificar si la sola cuantificación de células reguladoras es suficiente para identificar una propensión al rechazo.
- (5) Valorar la utilidad del empleo de las correlaciones clínicas de los Tregs en la identificación de la predisposición al rechazo.

- (6) Predecir los eventos clínicos negativos del postrasplante (rechazo agudo, nefropatía crónica del injerto) con ayuda del inmunocontrol mediante los parámetros de función del injerto (aclaramiento de creatinina, proteinuria...).
- (7) Verificar si los porcentajes de Tregs y su interpretación en el contexto clínico de cada trasplantado permiten ajustes del tratamiento inmunosupresor que ayuden a prevenir el rechazo.
- (8) Comprobar que se puede predecir el rechazo con el inmunocontrol.
- (9) Verificar que el inmunocontrol permite identificar a los trasplantados con cánceres e infecciones con propensión a la alorreactividad y si esta propensión se traduce finalmente en eventos de rechazo.
- (10) Verificar si en los trasplantados con cánceres e infecciones puede existir una respuesta de tolerancia exacerbada.
- (11) Evaluar la influencia de la terapia con inhibidores de mTOR sobre las infecciones del postrasplante y si se ven afectadas las células reguladoras.
- (12) Valorar el impacto de la inmunotolerancia en el desarrollo de los cánceres e infecciones del postrasplante.



# 4. Material y métodos



# 4. Material y métodos

## 4.1 Diseño del estudio

El estudio se compuso de dos subestudios descriptivos y transversales en el que se recogieron datos demográficos, clínicos, analíticos y muestras biológicas de los participantes.

El primer subestudio que se diseñó, que denominamos Subestudio 1, tuvo por finalidad definir los umbrales de normalidad de las células T reguladoras circulantes en la población trasplantada que es seguida en el Servicio de Nefrología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (HCUV), y si existen diferencias con respecto a la población sana no trasplantada. Quisimos además poder identificar aquellas situaciones clínicas a favor de un estado pro-inflamatorio persistente y predisponiendo al rechazo, si éstas se traducen en recuentos bajos de células reguladoras, y si los pacientes propensos a hacer un rechazo del alo-injerto finalmente presentan dicho evento.

El segundo subestudio, que denominamos Subestudio 2, evaluó los valores de células T reguladoras circulantes en los pacientes trasplantados renales afectados de cánceres o infecciones, y la eventual influencia de la medicación inmunosupresora para

favorecer una predisposición al desarrollo de tales complicaciones vía mecanismos tolerógenos o no tolerógenos.

## 4.2 Población de estudio

La muestra la constituyeron pacientes trasplantados renales seguidos en la Unidad de Trasplante Renal del Servicio de Nefrología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

A los pacientes se les incluyó de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión establecidos para cada subestudio.

Se incluyó un total de 46 pacientes, que colaboraron voluntariamente para la cuantificación de células T reguladoras (determinación de Tregs) el día que acudían a consulta de revisión de trasplante renal, tras explicarles verbalmente en qué consistía el estudio y después de firmar el consentimiento informado respectivo.

Los trasplantados renales que participaron lo hicieron en los dos subestudios diseñados según correspondió.

- 35 trasplantados renales con buena evolución postrasplante y sin ningún problema de salud concomitante (Subestudio 1).
- 11 trasplantados renales afectados de cánceres o infecciones (Subestudio 2).

## 4.3 Población control

Prestaron también su colaboración 15 controles sanos, reclutados entre los trabajadores del HCUV, de edad y sexo similares a los pacientes. Ninguno de estos voluntarios tenía antecedentes clínicos relevantes, ni presentaban signos de infección ni condición inflamatoria alguna en el momento de la recogida de la muestra.

## 4.4 Comité de ética y consentimiento informado

La aprobación del protocolo de estudio, tanto en los aspectos científico y ético se obtuvo del Comité Científico de Investigación Clínica de nuestro hospital. Además, todos los pacientes firmaron el consentimiento informado (ver Anexo 2), a través del cual aceptaban su participación en el estudio.

## 4.5 Criterios de inclusión y exclusión

### 4.5.1 Subestudio 1

#### CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Primer trasplante.
- Ninguna exclusión por edad.
- Causa de la ERC: causa desconocida, nefroangiosclerosis, uropatía obstructiva, poliquistosis hepatorrenal y otras causas genético-hereditarias.

#### CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Segundos y ulteriores trasplantes.
- Nefropatía diabética.
- Glomerulopatías.
- Afecciones auto-inmunes y procesos inflamatorios de origen infeccioso tales como tuberculosis, hepatitis crónicas, brucelosis, parasitosis sistémicas, etc.
- Amiloidosis AA, en el contexto de procesos inflamatorios sistémicos de larga evolución como el lupus o la artritis reumatoide de más de 10 años de evolución,

pero también las que aparecieron en el evolutivo de afecciones crónicas de origen infeccioso.

- Amiloidosis AL, gammapatía monoclonal incluyendo la gammapatía monoclonal de significado incierto, y todas las hemopatías oncológicas.
- Cualquier neoplasia ocurrida en los últimos 5 años.
- Hiperinmunizados.
- Eventos de rechazo previos (agudo, crónico, celular, humoral).
- Embarazo y transfusiones en el último año.
- Seroconversión frente a citomegalovirus en los últimos 6 meses.

## **4.5.2 Subestudio 2**

### **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Trasplantados que, en el último año, ha sido diagnosticados de alguna neoplasia o se han visto afectados por alguna infección que requirió de ingreso hospitalario.
- Necesariamente debían seguir estos pacientes una inmunosupresión con inhibidores de mTOR (rapamicina o everólimus) durante un año por lo menos previo al diagnóstico de la neoplasia o la infección.

## CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

No hubo criterios de exclusión.

## 4.6 Metodología

### 4.6.1 Muestras recogidas

A los pacientes trasplantados renales incluidos se les llamó por teléfono previamente para preguntarles si deseaban participar en el estudio e indicarles, en caso de respuesta afirmativa, que recibirían por correo un volante extra de solicitud de analítica, que la extracción de la muestra correspondiente a dicho volante era la del estudio, y que se llevaría a cabo conjuntamente con el resto de lo solicitado para la consulta de revisión que les tocaba. Se les indicó que ya en consulta se les explicaría al detalle los pormenores de su participación en nuestro estudio, que firmarían el consentimiento informado correspondiente y que si lo deseaban podían revocar en todo momento su participación.

Conocido el número y los nombres de los pacientes finalmente incluidos, éstos se transmitieron al personal de enfermería del Laboratorio Central, indicando el día que venían

a la extracción de la muestra, y que la muestra que requeríamos se debía obtener conjuntamente con el resto de lo solicitado en el control analítico respectivo.

A todos los pacientes participantes y controles sanos se les tomó una muestra de sangre periférica mediante venopunción, éstas se conservaron a temperatura ambiente con anticoagulante EDTA (ácido etilendiaminotetraacético).

## **4.6.2 Cuantificación de células T reguladoras por citometría de flujo**

### **LA TÉCNICA**

En los últimos años, el diagnóstico clínico ha experimentado profundas modificaciones debidas, en gran medida, a los avances producidos por los nuevos métodos cuantitativos de análisis celular. Entre ellos destaca la citometría de flujo, que ha alcanzado gran relevancia, además de la que ya tenía en investigación básica.

La citometría constituye un complemento valioso de las técnicas clásicas utilizadas para el estudio de la morfología, biología y bioquímica celular. Aunque, desde el punto de vista cronológico, la citometría de flujo es una tecnología relativamente reciente, sus características especiales como técnica de análisis celular han hecho de que en la última década su uso se haya extendido de forma rápida, desde los laboratorios de investigación básica hasta los laboratorios clínicos.

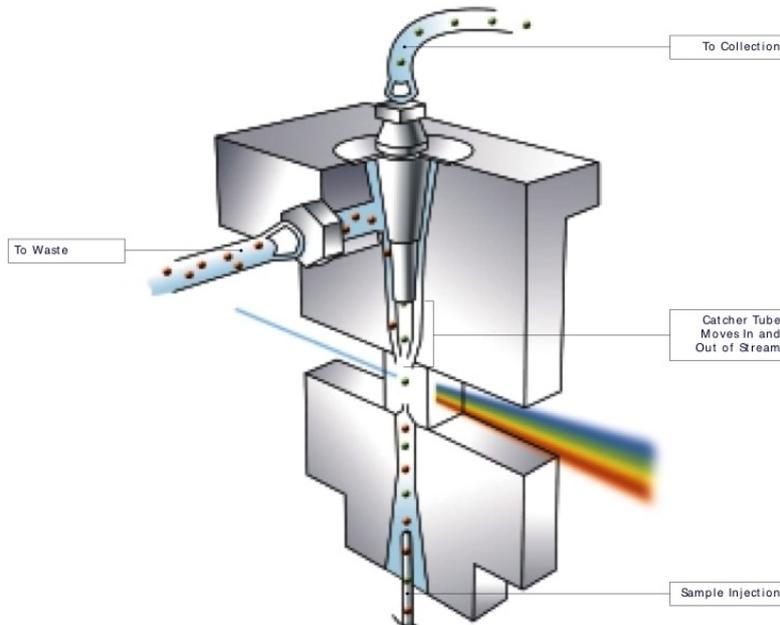
La citometría de flujo ha encontrado amplia utilidad en ciencias como la inmunología, hematología, oncología, anatomía patológica y biología celular. La conjugación de marcadores fluorescentes con anticuerpos monoclonales o policlonales ha hecho posible los estudios de la densidad y distribución de determinantes y receptores de la superficie y del citoplasma celular, permitiendo identificar subpoblaciones celulares.

Por otra parte, en comparación con los métodos bioquímicos de análisis celular, en los que se obtiene un resultado promedio para toda la muestra, la citometría de flujo es capaz de proporcionar una información cuantitativa sobre cada célula en particular y permite identificar en una muestra subpoblaciones de células diferentes, incluso cuando están escasamente representadas.

La citometría de flujo representa un método rápido, objetivo y cuantitativo para el análisis de células, núcleos, cromosomas, mitocondrias u otras partículas en suspensión.

El principio en el que se basa esta tecnología es simple: hacer pasar células u otras partículas en suspensión alineadas y de una en una por delante de un haz luminoso. La información producida puede agruparse en dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de la luz (tamaño, complejidad) y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos unidos a la célula o partícula al ser excitados por el rayo luminoso. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por un ordenador (Figura 3).

Figura 3.—Celda de flujo laminar FACSCalibur™ (BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.)



Una fuente emisora de luz monocromática, usualmente un haz de luz láser envía un rayo que es colimado y enfocado por medio de lentes sobre la cámara de flujo laminar (velocidad de captura de 300 células/segundo). La luz dispersada y fluorescencia son recogidas por los respectivos detectores.

## CONCEPTO DE INMUNOFLUORESCENCIA

El término inmunofluorescencia se usa para describir las técnicas en que se emplea un fluorocromo para marcar un anticuerpo. La fluorescencia ha sido usada para visualizar ciertas moléculas y estructuras por medio de la microscopía óptica durante muchos años. Ésta ha encontrado una extensa área de aplicación en la citometría de flujo. La capacidad para detectar simultáneamente la fluorescencia de dos, tres, cuatro o actualmente hasta 13 fluorocromos de diferentes longitudes de onda (ver Anexos), abre completamente el campo del análisis multiparamétrico.

Cuando una molécula absorbe luz, y por tanto energía, algunos de sus electrones pueden alcanzar una órbita de mayor energía. Se dice entonces que la molécula ha alcanzado un estado de excitación, y puede volver a su estado basal cuando estos electrones vuelven a su órbita de menor energía. En algunos compuestos el electrón excitado cae rápidamente, usualmente en nanosegundos, al estado basal, emitiendo un cuanto de luz o fotón y desprendiendo energía. Esta transición radiante se denomina fluorescencia. A este tipo de compuestos se les denomina fluorescentes o fluorocromos.

El objetivo del análisis por inmunofluorescencia en citometría de flujo es poder asignar cada célula a un grupo específico de células que comparten propiedades comunes. El primer paso es identificar las células de interés. Por ejemplo, para el análisis de las poblaciones linfocitarias se requiere seleccionar un área de trabajo distinguiendo los leucocitos por sus propiedades de dispersión de luz (tamaño contra complejidad celular). Una vez que las células de interés han sido distinguidas de los otros tipos celulares, se puede usar la inmunofluorescencia para determinar la proporción o el número de células que poseen un determinado marcador, por ejemplo, del marcador CD4 para el seguimiento del progreso de la enfermedad por el VIH, entre muchas otras aplicaciones clínicas.

## INMUNOFENOTIPIACIÓN

La citometría de flujo es una técnica que permite un análisis celular multiparamétrico de forma rápida, sensible y específica. La disponibilidad de amplios paneles de reactivos de gran calidad facilita la aplicación de este método analítico en el

diagnóstico, clasificación, evaluación pronóstica y valoración de enfermedad mínima residual. La citometría de flujo permite el análisis de un gran número de células (habitualmente entre 10000 células por muestra y más de un millón en los estudios de enfermedad mínima residual). La aplicación de la citometría de flujo al análisis celular permite conocer aspectos físicos de la célula (tamaño y complejidad) y determinar la presencia o ausencia de determinados antígenos (habitualmente entre 3 y 4) en los diferentes compartimentos celulares (superficie celular, citoplasma, mitocondria y núcleo), lo que contribuye a aumentar tanto la sensibilidad como la especificidad de la prueba. En otras áreas como en el diagnóstico y clasificación de las inmunodeficiencias primarias, en el monitoreo de enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple, el lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoide, la citometría de flujo ha demostrado su utilidad. También se ha demostrado útil en el seguimiento de la recuperación inmune tras el trasplante de médula ósea, en la identificación precoz del rechazo en pacientes que han recibido un trasplante alogénico, o en el monitoreo terapéutico de los enfermos con anemia aplásica.

## CITÓMETRO DE FLUJO

Los citómetros de flujo modernos (Figura 4) son capaces de analizar varios miles de partículas por segundo en tiempo real, y pueden separar y aislar activamente partículas de acuerdo a sus propiedades específicas. Un citómetro de flujo es en cierta forma similar a un microscopio, salvo que, en vez de producir imágenes de las células, los citómetros de flujo ofrecen una cuantificación automática de una serie de parámetros con altísima calidad.

Figura 4.—Citómetro de flujo BD FACSCalibur™



Un citómetro de flujo tiene cinco componentes principales.

- La celda de flujo laminar, donde dos fluidos (suero fisiológico, PBS, aire), uno que contiene en suspensión a la muestra y otro que lo envuelve para darle estabilidad, circulando en régimen de flujo laminar acarrean y ponen en línea a las células de modo que pasen a través del rayo de luz de a una y en fila.
- Un sistema de medición, los más comúnmente utilizados son la medición de la impedancia o conductividad (principio Coulter) y los sistemas ópticos (lentes de enfoque, sistema de espejos y filtros).
- Un sistema de iluminación o fuente de luz, formado ya sea por lámparas de alta luminosidad (de mercurio, xenón), láseres de alta potencia refrigerados por agua (de argón, de criptón, de tinturas), láseres de baja potencia refrigerados por aire (de argón  $\lambda$  – longitud de onda – 488 nm), láser rojo de helio-neón ( $\lambda$  633 nm),

verde de helio-neón, ultravioleta de helio-cadmio, y láseres de diodo de baja potencia (azul, verde, rojo, violeta).

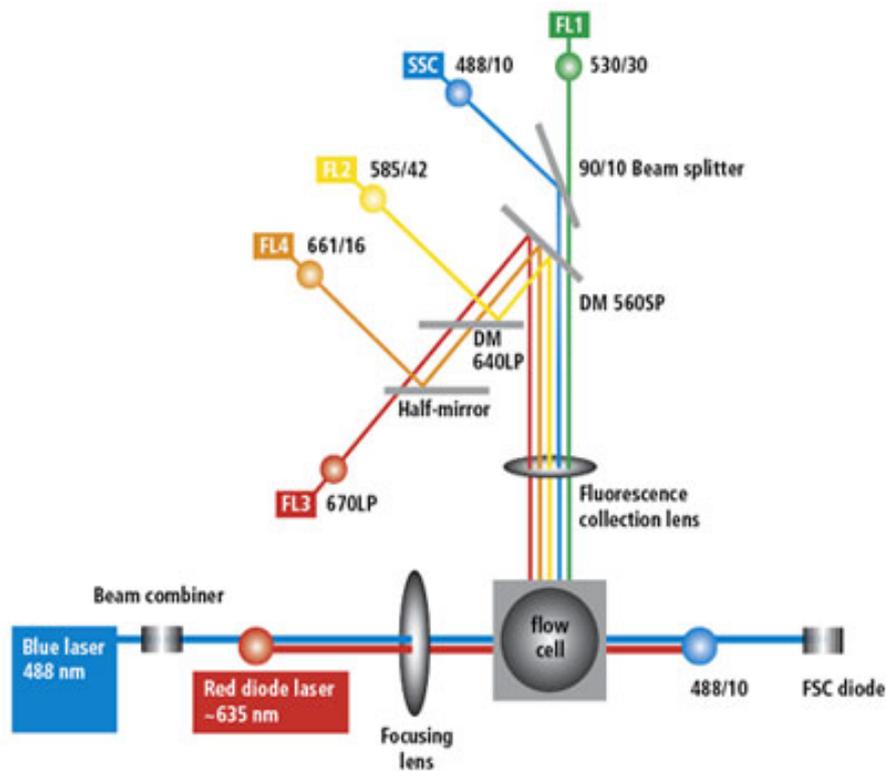
- Detectores, los cuales registran la señal producida: fotodetectores diodo para la dispersión frontal o Forward Scatter (FSC), y fotomultiplicadores para la dispersión lateral o Side Scatter (SSC) y las señales de fluorescencia.
- Un sistema de conversión y amplificación, para hacer que la señal detectada pueda ser procesada por un ordenador
- Un ordenador para el análisis de las señales.

El proceso de recolección de datos a partir de las muestras utilizando un citómetro de flujo es conocido como adquisición. La adquisición es mediada por un programa presente en el ordenador físicamente conectado al citómetro de flujo. Este programa es capaz de ajustar varios parámetros de la medición para cada una de las muestras analizadas, y además se encarga de asistir en la presentación inicial de la información de las muestras mientras se realiza la adquisición de los datos, para asegurar que los parámetros han sido correctamente ajustados. Los primeros citómetros de flujo eran en su mayoría dispositivos experimentales, sin embargo los avances técnicos desde su origen han permitido que ahora tengan una gran cantidad de aplicaciones tanto clínicas como en investigación. Debido a estos desarrollos, se ha producido un considerable mercado de instrumentos, programas de análisis, y reactivos utilizados tanto en la adquisición como en el mercado fluorescente con anticuerpos.

Los instrumentos modernos en general poseen múltiples láseres y detectores. El récord actual para un instrumento comercial es de cuatro láseres y 18 detectores de fluorescencia. Al aumentar el número de láseres y detectores, es posible aumentar la

cantidad de anticuerpos fluorescentes utilizados para el marcado, lo que hace posible identificar con mayor precisión la población de interés a través de sus marcadores fenotípicos.

Figura 5.— Componentes del sistema óptico BD FACSCalibur™



Dos láseres, de argón y diodo rojo, espacialmente dispuestos y lo suficientemente potentes para iluminar la mayoría de las células, permiten el análisis multicolor. FSC es recogido hacia adelante. SSC y las señales de fluorescencia se recogen a 90 grados. En el pase corto ( $\lambda$  560 nm) un espejo dichroico refleja las fluorescencias roja y amarillo-naranja. La luz que pasa se dirige hacia el fotomultiplicador FL1 (verde) con una fracción del 10% que se separa para proporcionar la señal SSC. En el pase largo ( $\lambda$  640 nm) un espejo dichroico refleja la luz amarilla a FL2. Un medio espejo refleja la luz naranja a FL4, la luz roja que pasa se dirige a FL3.

Para la determinación de Tregs utilizamos un citómetro de flujo FACSCalibur™ (BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.) (ver Anexo 3), compuesto por dos láseres (Figura 5),

de argón ( $\lambda$  488 nm) y diodo rojo ( $\lambda$  635 nm), y un sistema óptico conformado por 4 fotomultiplicadores (tres para la excitación azul y uno para la excitación roja) dispuestos radialmente en orden decreciente de acuerdo a la longitud de onda.

## MONOCLONAL UTILIZADO

En citometría de flujo se pueden utilizar una amplia gama fluorocromos. Éstos, por lo general, se encuentran químicamente unidos a anticuerpos específicos capaces de reconocer una determinada molécula diana en la superficie o en el interior de la célula. Estas etiquetas fluorescentes también pueden adosarse a casi cualquier compuesto químico que presente una cierta afinidad por la membrana o alguna otra estructura celular. Cada fluorocromo posee un pico de excitación característico y una longitud de onda de emisión también característica. Sin embargo, los espectros de emisión de estos fluorocromos con frecuencia se superponen, por consiguiente, las combinaciones de fluorocromos que pueden ser usadas dependen de la longitud de onda de la lámpara(s) o láser(es) usados para excitar a los mismos y de los tipos de detectores que se encuentren disponibles.

Los fluorocromos más frecuentemente utilizados son el isotiocianato de fluoresceína (FITC), la ficoeritrina (PE), la peridin clorofil proteína (PerCP), Alexa Fluor 488 para el láser argón, y aloficocianina (APC) y Alexa Fluor 647 para el láser helio-neón. Ciertos fluorocromos compuestos (tándems), formados por un primer fluorocromo cuya luz emitida permite activar al segundo fluorocromo con una longitud de onda más elevada (FRET – principio de transferencia de energía –), permiten utilizar más colores con el

mismo número de láseres. Usualmente asocian ficoeritrina o alofococianina con rojo texas, cianinas (Cy) o Alexa Fluor.

Los fluorocromos presentan rendimientos cuánticos muy diferentes (APC > PE-Cy5 > PE > PerCP > FITC > APC-C7 > PE-Cy7), por lo que en su elección debe tenerse en cuenta el nivel de expresión del marcador a estudiar (las expresiones bajas pueden ser infravaloradas con fluorocromos poco luminosos).

El número máximo de marcadores fluorescentes distinguibles se cree que se encuentra entre 17 ó 18, y este nivel de complejidad requiere de un laborioso proceso de optimización para limitar los artefactos, así como complejos algoritmos de deconvolución (compensación) para separar los espectros solapados (spectral overlap). Los artefactos en la detección de la fluorescencia constituyen una traba importante puesto que no se identifican hasta el momento mismo del análisis y deben tenerse especialmente en consideración para la identificación de poblaciones linfocitarias en base a criterios de intensidad de fluorescencia o de combinaciones no convencionales.

Las células T reguladoras constituyen una rara población que representa 5-10% de todas las células CD4<sup>+</sup> circulantes. La identificación del CD127 como marcador de estas células convierte al marcaje de membrana en una alternativa al marcaje intra-celular Foxp3, que presenta la desventaja de requerir la permeabilización de las células para su identificación [109]. Además, la constatación de que células CD4<sup>+</sup> CD127<sup>low/-</sup> CD25<sup>-</sup> pueden comportarse como Tregs, deja ver que el porcentaje total de estas células puede ser mayor.

Adquirimos el monoclonal BD Pharmingen™ Human Regulatory T Cell Cocktail (ver Anexo 4) para la cuantificación de células T reguladoras. Se trata de un reactivo tres colores incluyendo tres anticuerpos, anti-CD4 FITC (clona SK3), anti-CD25 PE-Cy™7 (clona 2A3) y anti-CD127 Alexa Fluor® 647 (clona hIL-7R-M21), en presentación conjunta y listos para el marcado directo en un sólo paso. Este monoclonal podía utilizarse combinado a otros reactivos de marcado, incluyendo el Foxp3, y en la mayoría de citómetros de flujo de la marca BD FACST™, incluyendo BD FACSCalibur™.

No obstante, analizar una población tan compleja con sólo tres parámetros parecía de una extremada simpleza y podía explicar la falta de interés de los nefrólogos que se dedican al trasplante por este análisis en mención de potenciales sesgos.

## PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Siguiendo las indicaciones del fabricante, las muestras de sangre extraídas de todos los participantes en este estudio fueron tratadas en las 6 horas siguientes a su recogida, para luego ser analizadas en la hora después del marcaje.

Las muestras se marcaron con los 3 anticuerpos simultáneamente, que se agregaron a la muestra de sangre total (50µL exactos con pipeta electrónica calibrada) y se dejó incubar a temperatura ambiente en la obscuridad durante 30 minutos. A continuación, las muestras se trataron en un tiempo (eritrolisis tras adición manual de 500µL de solución FACSlyzing®, BD Biosciences) y fueron analizadas en la hora. La dilución final fue de 50µL de sangre en 570µL finales.

## "GATING" O VENTANEO

Los datos generados por los citómetros de flujo pueden ser dibujados en relación a una variable, en forma de histograma, o en gráficos de puntos (dot-plot) de dos dimensiones y dos o más variables, o incluso en gráficos tridimensionales. Las regiones delimitadas en estos gráficos pueden ser separadas secuencialmente, de acuerdo con la intensidad de la fluorescencia, para crear una serie de subgrupos llamados "gates" (ventanas). La estrategia para una correcta separación en gates, proceso conocido como "gating" (ventaneo), tiene un papel determinante en la identificación de poblaciones celulares como la de linfocitos circulantes.

La caracterización de la población linfocitaria T, extremadamente diversa, en especial de los linfocitos T no convencionales, que se apoya en el nivel de expresión (MFI – intensidad media de fluorescencia –) y la presencia inhabitual de marcadores de membrana, requiere reducir al máximo los artefactos, lo mismo que la inestabilidad (fluctuaciones en la potencia del láser o en el flujo de la muestra, desalineamiento de los sistemas de lentes) y la no linealidad de las respuestas de los fotomultiplicadores, incluyendo defectos en el procesamiento de las señales y la desactivación fluorescente "quenching" dependiente de la concentración de fluorocromos, que puede evaluarse usando microesferas fluorescentes u otras partículas de referencia.

Los gráficos de citometría con frecuencia se hacen en función de escalas logarítmicas. Ya que los diferentes compuestos fluorescentes utilizados para hacer el marcado poseen espectros de emisión que con frecuencia se solapan, las señales recogidas por los detectores deben ser compensadas tanto electrónicamente como

informáticamente. Los datos acumulados por los citómetros pueden ser analizados utilizando diferentes programas, tales como por ejemplo WinMDI (el único que es freeware), Flowjo, FCS Express, VenturiOne, CellQuest Pro, Cytospec, etc. Una vez que se han recogido los datos, ya no es necesario que el ordenador siga conectado al citómetro, razón por la cual el análisis de datos se hace la mayor parte de las veces en otro ordenador. Esto se hace especialmente necesario en instalaciones centrales donde la utilización de estas máquinas se encuentra bajo alta demanda.

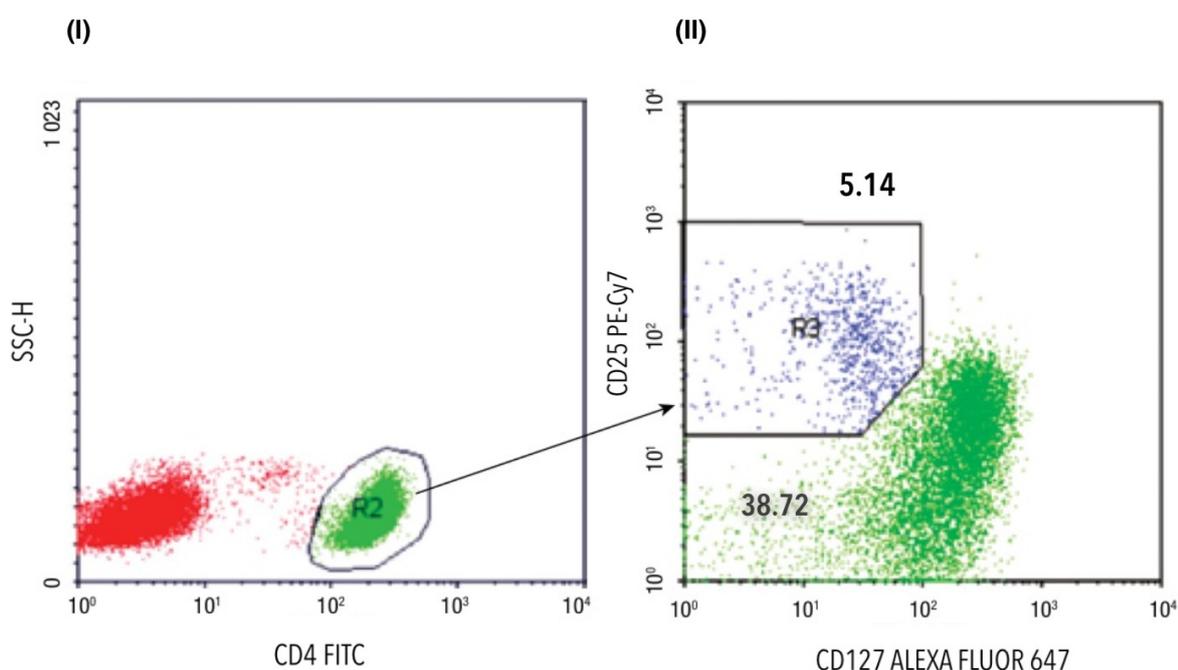
A efectos de la determinación de Tregs, calibrado el citómetro y calculadas las compensaciones, se fijó el análisis en 10000 linfocitos. La estrategia de identificación fue la recomendada por el fabricante, asistida por el programa BD CellQuest Pro (BD Biosciences) que midió las proporciones y calculó los porcentajes de las poblaciones estudiadas. Los valores absolutos no se analizaron. Los ajustes se comprobaron diariamente.

Se identificaron los linfocitos totales sólo por sus parámetros físicos (tamaño versus complejidad), sin necesidad de marcado con CD3, y a partir de éstos se seleccionaron los linfocitos T CD4<sup>+</sup> por la expresión del cúmulo de diferenciación respectivo y por su complejidad (Figura 6). La observación fina de los aspectos y niveles de fluorescencia de las diferentes subpoblaciones CD4<sup>+</sup> permitió apreciar las diferencias que ayudaron en la identificación de las mismas. El análisis de los resultados gráficos permitió visualizar dos subpoblaciones linfocitarias CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> diferentes según el nivel de expresión de CD127 (Figura 6), siendo reducido en las células T reguladoras (nTregs + células Th3) comparado a las células T activadas o efectoras. Los valores de estas células se definieron como una proporción respecto al total de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, expresándose dicha proporción en porcentaje.

Resultó de interés identificar también las células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> CD127<sup>-</sup>, considerando que el 25% de las mismas eran auténticas células T reguladoras Foxp3<sup>+</sup> [109, 110].

El contingente CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> CD127<sup>-</sup> mostraba una gran variabilidad inter-individual. Pensábamos que, si ésta era la huella de la influencia micro-ambiental (inflamación, inmunosupresión) sobre la diversidad y la dinámica de los Tregs [56, 82, 151, 155, 156], no recurriendo al marcaje intra-celular Foxp3, podíamos identificar las células Tr1 con el monoclonal que utilizamos, dividiendo entre cuatro los valores de la proporción obtenidos de las células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> CD127<sup>-</sup>.

**Figura 6.—Ejemplo de cuantificación de linfocitos Treg por citometría de flujo**



Los gráficos corresponden a un experimento. Las muestras se marcaron simultáneamente con anticuerpos anti-CD4, anti-CD25 y anti CD127. (I) A partir de los linfocitos totales contenidos en R1 (gráfico no mostrado) identificados por sus parámetros físicos (FSC versus SSC), fueron seleccionados en R2 los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. (II) En R3 fue identificada la subpoblación CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> con indicación de su respectivo porcentaje. Fueron también identificadas las células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> CD127<sup>-</sup> cuya proporción destacaba por su gran variabilidad inter-individual.

Consideramos, a efectos del análisis estadístico y de interés clínico, las subpoblaciones linfocitarias exponiendo el fenotipo CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> que incluyeron las células T reguladoras naturales y las células T reguladoras adaptativas Th3 (variable Tregs). Los porcentajes de células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> CD127<sup>-</sup> sólo se tomaron en cuenta a título orientativo, fundamentalmente en la cohorte de los 11 trasplantados con cánceres e infecciones.

### **4.6.3 Definición de los umbrales de normalidad**

Los porcentajes de células T reguladoras naturales y adaptativas Th3 consideradas, se sometieron al análisis descriptivo correspondiente. Nos cercioramos de la normalidad de la distribución de estos porcentajes (prueba de Kolmogorov-Smirnov) en los trasplantados renales de evolución favorable y los controles sanos, para de esta manera proceder al cálculo de la media y la desviación estándar respectivos.

Se fijaron los umbrales de normalidad en los trasplantados de buena evolución tras conocer la distribución de frecuencias de células T reguladoras (calculadas la media y la desviación estándar), y se exploró la existencia de diferencias con respecto a la distribución observada en los controles sanos (prueba del Chi-cuadrado). De esta manera, pudimos saber si estos umbrales de normalidad eran los mismos en la población general no trasplantada.

También se calculó la media y la mediana de los porcentajes de células reguladoras en los trasplantados con cánceres e infecciones. Pero, no se creyó pertinente

comparar a estos trasplantados "enfermos" con los controles sanos, ni tampoco con los trasplantados de buena evolución, debido esto a la repartición de frecuencias para las células Tregs diferente y por las obvias diferencias clínicas.

#### **4.6.4 Porcentajes de Tregs por inmunosupresor**

Los trasplantados renales de buena evolución conformaron dos grupos: anticalcineurínicos (n=18) e inhibidores de mTOR (n=17). Los tratamientos adyuvantes como los corticoides, la azatioprina o los derivados del ácido micofenólico (MMF o micofenolato sódico) no fueron considerados.

Con el test estadístico apropiado se comparó la distribución de frecuencias de Tregs entre ambos grupos y entre subgrupos de inmunosupresores (ciclosporina, tacrólimus, rapamicina, everólimus).

Puesto que todos los pacientes incluidos en el Subestudio 2 seguían una inmunosupresión con inhibidores de mTOR, no se llevó a cabo comparación alguna entre los trasplantados con cáncer y los trasplantados infectados incluidos.

## 4.6.5 La consulta de revisión

### IMPLEMENTACIÓN DEL INMUNOCONTROL

El estudio de la "semiología" de la dinámica de las subpoblaciones linfocitarias reguladoras como medio para predecir la evolución del trasplante y los eventos clínicos negativos del postrasplante son tan importantes como el análisis fiable de estas subpoblaciones. No obstante, numerosas situaciones se conocen mal todavía y carecen de marcadores diagnósticos o pronósticos para un seguimiento de la capacidad supresora de los Tregs en la clínica [111-114].

Las correlaciones clínicas de la dinámica de los Tregs mejoran el seguimiento del conteo del conjunto circulante de estas células y permiten el desarrollo de un inmunocontrol en trasplante renal [222]. La Medicina Basada en la Evidencia permite la aplicación de los resultados de la evaluación de todas las correlaciones clínicas encontradas según su nivel de evidencia; la creación de scores pronósticos o de riesgo que permitan cuantificar el impacto del establecimiento de una regulación dependiente de las células Treg es el objetivo que se busca. La ventaja es un análisis fino y riguroso de las modificaciones terapéuticas para llegar a ajustes terapéuticos precisos con el fin de predecir y si fuera posible prevenir los eventos clínicos negativos del postrasplante (rechazo agudo, nefropatía crónica del injerto, etc), así como las consecuencias de una intensa inmunosupresión; todas capaces de influenciar la supervivencia de trasplante y trasplantado. La validación de estos scores sin embargo en cohortes significativas de pacientes es indispensable.

La creación del Score de Tolerancia Inmunológica Clínica [222] es el fruto de un largo trabajo pilotado por Julien Zuber, Nefrólogo del Trasplante del Hospital Necker de Paris, que reúne nefrólogos e inmunólogos de las ciudades francesas de Tours y Saint-Étienne, de Bruselas (Bélgica), de Lausana y Ginebra (Suiza), y Valladolid. Este score pronóstico o de riesgo integra y busca la aplicación de todos los correlatos clínicos de los Tregs de los que se tiene conocimiento, de acuerdo a su nivel de evidencia, y es el primero que tiente el desarrollo de una estrategia de inmuno-vigilancia en la clínica.

- Una frecuencia de células T reguladoras "favorable" obtenida por citometría de flujo (permitidos los marcajes de membrana) es la prueba irrefutable de un estado de tolerancia "aceptable" [109, 110]. El ratio Tregs / Tefecs debe considerarse a título orientativo, sobre todo en los contextos de intensa inflamación y bajo la influencia de la inmunosupresión [228].
- La existencia de un cáncer, especialmente los cánceres cutáneos no melanoma, se asocian a altos porcentajes de Tregs atestiguando por una respuesta reguladora exagerada que hace temer la recidiva [111-113].
- Concerniendo a las enfermedades infecciosas, aunque éstas puedan agravarse bajo el tratamiento con inhibidores de mTOR, una respuesta tolerógena exagerada es también responsable de su progresión [165]. Una consecuencia inevitable de una infección es la ruptura de un estado de tolerancia dominante [228].
- Los esquemas comportando una minimización de anticalcineurínicos con inhibidores de mTOR [229-231], inicio de novo con inhibidores de mTOR reforzados con MMF sin inhibidores de la calcineurina [232], conversión de anticalcineurínicos a inhibidores de mTOR después del primer año postrasplante [233], y conversión precoz a inhibidores de mTOR después de una fase inicial con anticalcineurínicos [234-236], permiten una inmunosupresión eficaz (sinergia)

evitando la nefrotoxicidad, se asocian a una mejor función renal con menos hipertensión arterial, son más seguros frente a los cánceres e infecciones oportunistas, y están a favor de una respuesta tolerógena suficiente.

- Un tratamiento de inducción con basiliximab o daclizumab se recomienda, en lugar de ATG o alemtuzumab, en los objetivos de favorecer la respuesta reguladora [228].
- La constatación del efecto anti-tolerancia de los anticalcineurínicos no se ha traducido en una contraindicación clara y fehaciente para la utilización de estos medicamentos que constituyen aún la piedra angular del tratamiento inmunosupresor.
- Las células T reguladoras Foxp3<sup>+</sup> están relacionadas positivamente con el filtrado glomerular [223]. Éstas se encuentran significativamente menos representadas a distancia del trasplante, en relación con la evolución funcional del injerto. Una caída significativa del número de células reguladoras está documentada desde 6-8 semanas después del trasplante y permanece en niveles bajos hasta los 6-8 meses postrasplante [226, 227].
- Tiempo sospechada, ahora se acepta que la microalbuminuria puede predecir la pérdida del injerto renal [237]. La microalbuminuria es habitualmente el reflejo de la degradación progresiva de la función del injerto [238] y del mantenimiento de un estado pro-inflamatorio [224, 225]. Ésta de ser considerada como un factor anti-tolerancia.
- Además de las modificaciones de la inmunosupresión hacia los esquemas llamados no nefrotóxicos [229-236], el tratamiento de los factores no inmunológicos (protección nefrónica) debe también considerarse. Por lo tanto, el control de la hipertensión [239, 240], el tratamiento con estatinas [241, 242] y la corrección de la anemia con AEE [243, 244] deberían ser considerados como promotores de

tolerancia pues se oponen a las consecuencias deletéreas de un estado pro-inflamatorio persistente. Recientemente se ha mostrado que el tratamiento del hiperparatiroidismo secundario con paricalcitol conllevó efectos anti-inflamatorios importantes comparado a calcitriol in vitro e in vivo [245], pudiendo favorecer una respuesta tolerógena. La progresión de una aterosclerosis conocida, los marcadores analíticos de inflamación y los antecedentes de rechazo estarían también a favor de un estado pro-inflamatorio y anti-tolerancia.

El STIC se compone de 6 ítems ponderados, que se puntúan de manera dicotómica (si o no). El peso de cada uno de los correlatos clínicos de los Tregs en cada uno de los ítems se establece por su nivel de evidencia y sus puntajes se expresan en números absolutos (de 0 a 24). Se fija en 18 puntos el umbral para dar el calificativo de "tolerante" o "no tolerante". Un porcentaje de Tregs "favorable", definido por un valor mayor o igual al fijado por el laboratorio como el límite inferior, suma 12 puntos a efectos de la puntuación (Ia). Presentar una neoplasia o desarrollar una infección suma 6 puntos (IIa). Los esquemas no nefrotóxicos o la inducción no linfodepletante con un anti-CD25 suma 6 puntos más (IIb). La baja del FG sustrae 3 puntos y la microalbuminuria sustrae 3 puntos más (IIb). El tratamiento con anticalcineurínicos sustrae 1 punto (III), lo mismo que todos los signos clínicos o biológicos que atestiguan por un estado pro-inflamatorio tales como la anemia, el hiperparatiroidismo secundario, el empeoramiento de una aterosclerosis preexistente, los marcadores analíticos de inflamación, etc (III). Finalmente, el antecedente de rechazo sustrae 1 punto más (III).

Los trasplantados renales participantes fueron vistos en consulta el día que les tocaba revisión, recogándose la información que juzgamos necesaria para la implementación del inmunocontrol.

- Información demográfica (edad y sexo).
- Datos clínicos y analíticos para obtener una puntuación en el STIC.
- Cánceres en el último año: tipo, tratamiento propuesto, cambios en la inmunosupresión.
- Infecciones en los últimos 6 meses: necesidad de ingreso hospitalario, respuesta al tratamiento.
- Eventos de rechazo previos: tipo, corticosensibilidad, necesidad de tratamiento con anticuerpos anti-linfocitarios y/o inmunoglobulinas, plasmaféresis.
- Disfunción crónica del injerto.
- Estratificación del riesgo cardiovascular (recomendaciones ESH/ESC 2013).
- Eventos cardiovasculares en el último año: isquemia miocárdica, accidentes cerebro-vasculares, vasculopatía periférica.
- Niveles del inmunosupresor y modificaciones en la posología de la inmunosupresión llevadas a cabo.
- Motivo de la sustitución de los inhibidores de la calcineurina por inhibidores de mTOR.
- Parámetros de función del injerto renal: creatinina plasmática (en mg/dl), aclaramiento de creatinina en orina de 24 horas ajustado por superficie corporal, FG calculado por la fórmula MDRD (en ml/min/1,73m<sup>2</sup>), microalbuminuria en orina de 24 horas (30-300mg/24 horas), proteinuria en orina de 24 horas (>300mg/24 horas), cociente microalbuminuria / creatinina (>30mg/g).
- Anemia de insuficiencia renal resistente al tratamiento con eritropoyetina y hierro.

- Hiperparatiroidismo secundario tratado con paricalcitol.
- Marcadores analíticos de inflamación: VSG>100mm, PCR>5mg/L, procalcitonina>0.5µg/L, aumento de proteínas de fase aguda, hipergammaglobulinemia policlonal, etc.
- Resultado del urocultivo protocolizado de la consulta.
- Otras intervenciones.

En nuestro estudio no incluimos ningún trasplantado siguiendo una asociación de inhibidores de la calcineurina con inhibidores de mTOR (porque pertenecían a otros estudios que demandaban exclusividad). De esta manera, para una correcta utilización del score, decidimos agregar los seis puntos para el ítem de tratamientos no nefrotóxicos en todos los casos en que el trasplantado seguía una inmunosupresión con algún inhibidor de mTOR.

Calculamos el ratio Tregs / Tefecs en los trasplantados con cánceres e infecciones, debido a su condición de trasplantados "enfermos" comparada con los trasplantados de buena evolución "saludables", con el fin de esclarecer la influencia del micro-ambiente local (inflamación, inmunosupresión) en la dinámica de los Tregs [56, 82, 151, 155, 156]. Pensábamos que si una respuesta de tolerancia exagerada podía encontrarse detrás de estos cánceres e infecciones, factores inmunológicos y no inmunológicos mermando la intensidad de esta respuesta en algún momento determinado, podrían predisponer al rechazo.

## 4.7 Variables recogidas

### 4.7.1 Determinación de Tregs

Todas variables cuantitativas expresadas en porcentaje.

- Células T reguladoras o Tregs.
- Células T activadas o Tefecs.
- Linfocitos T CD4<sup>+</sup> o TCD4

### 4.7.2 Inmunocontrol

Todas variables cualitativas dicotómicas (sí y no), para puntuar en el STIC.

- Anticalcineurínicos
- Inhibidores de mTOR
- Anticalcineurínicos + inhibidores de mTOR
- Cánceres en el último año
- Infecciones urinarias en los últimos 6 meses
- Otras infecciones en los últimos 6 meses
- Infecciones necesitando de ingreso hospitalario en los últimos 6 meses

- Descenso del FG calculado por la fórmula MDRD ( $>15\%$  en  $\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ )
- Microalbuminuria (30-300mg/24 horas) o proteinuria ( $>300\text{mg}/24$  horas) o cociente microalbuminuria / creatinina ( $>30\text{mg}/\text{g}$ ).
- Marcadores bioquímicos de inflamación: VSG $>100\text{mm}$ , PCR $>5\text{mg}/\text{L}$ , procalcitonina $>0.5\mu\text{g}/\text{L}$ , aumento de proteínas de fase aguda, hipergammaglobulinemia policlonal.
- Datos hematométricos de inflamación: anemia hipocrómica, leucocitosis, trombocitosis.
- Alargamiento del tiempo de cefalina presumiblemente inflamatorio.
- Descenso de las fracciones del complemento C3 y C4.
- Mal control de la hipertensión (recomendaciones ESH/ESC 2013).
- Mal control de la Diabetes (recomendaciones ADA 2012).
- Mal control del colesterol (recomendaciones del grupo de trabajo de lípidos KDIGO 2013).
- Eventos cardiovasculares en el último año: isquemia miocárdica, accidentes cerebro-vasculares, vasculopatía periférica.
- Anemia de insuficiencia renal resistente al tratamiento con eritropoyetina y hierro.
- Hiperparatiroidismo secundario.
- Eventos de rechazo previos.
- Disfunción crónica del injerto.

## 4.8 Método estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa Excel de Microsoft y la versión 15.0 del programa SPSS Inc.® (Chicago, IL, EE.UU.) para Windows.

Para las pruebas de contraste utilizadas se consideró un nivel de significación estadística al valor  $p \leq 0,05$ .

### 4.8.1 Análisis descriptivo

Respecto a las variables cuantitativas (determinación de Tregs), se calculó la media y la desviación estándar de los porcentajes de Tregs en los trasplantados de buena evolución y los controles sanos, previamente establecida la normalidad de la repartición de estos porcentajes (campana de Gauss) con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Por su parte, se calculó la media y la mediana de estos porcentajes en los trasplantados con cánceres e infecciones.

No se hizo el cálculo de ninguna medida de tendencia central ni de dispersión para las otras variables consideradas en la determinación de Tregs (Tefecs y TCD4).

Las variables cualitativas (inmunocontrol) se describieron por sus frecuencias absolutas y relativas (porcentajes).

## 4.8.2 Análisis bivariante

El análisis comparativo sólo incluyó los trasplantados renales de evolución favorable y los controles sanos. No se llevó a cabo comparación alguna entre los trasplantados con cáncer y los trasplantados infectados. Tampoco se comparó al conjunto de estos trasplantados "enfermos" ni con los controles sanos ni con los trasplantados renales de buena evolución.

Las comparaciones se hicieron sólo para la variable Tregs.

- Para comparar la distribución de frecuencias de Tregs entre los trasplantados de buena evolución y los controles sanos se utilizó la prueba del Chi-cuadrado.
- Para comparar al grupo de los anticalcineurínicos con los inhibidores de mTOR se utilizó la prueba de la U de Mann-Whitney.
- Para comparar a los subgrupos de inmunosupresores entre si, se utilizó la prueba de la H de Kruskal-Wallis.

## 4.8.3 Análisis multivariante

Debido a la asociación ya estructurada en forma de score de riesgo entre las correlaciones clínicas de los Tregs y la cuantificación de células T reguladoras circulantes, no se juzgó necesaria la realización de un análisis multivariante para estimar el impacto de la inmunotolerancia en estos pacientes.

# 5. Resultados



# 5. Resultados

## 5.1 Análisis descriptivo

### 5.1.1 Subestudio 1

En lo que concierne al Subestudio 1, los trasplantados participantes presentaron una media de porcentajes de Tregs de 22.1%. Las medias de porcentajes de Tregs por inmunosupresor fueron de 23.01% para ciclosporina, 10.07% para tacrólimus, 25.22% para rapamicina y 30.28% para everólimus (Tabla 1).

Recuérdese que los porcentajes de las subpoblaciones linfocitarias reguladoras cuantificadas incluyeron las células T reguladoras naturales y las células T reguladoras adaptativas Th3.

Sorprendió que el porcentaje de Tregs más bajo lo obtuviéramos con everólimus, en 7.30%. Sorprendió igualmente que obtuviéramos porcentajes de Tregs elevados en los pacientes que seguían una inmunosupresión con ciclosporina (n=4). Nos pareció que los resultados con ciclosporina no debían tenerse en cuenta por el restringido número de

pacientes tratados con este inmunosupresor, y decidimos no considerarlos a la hora de comparar a los subgrupos de inmunosupresores entre si.

**Tabla 1.—Porcentajes de Tregs por inmunosupresor (Subestudio 1)**

| Medicación   |              | TCD4 (%)** | Tregs (%)* |                |
|--------------|--------------|------------|------------|----------------|
| Ciclosporina | N            | Válidos    | 4          |                |
|              |              | Perdidos   | 0          |                |
|              | <b>Media</b> |            | 75,3600    | <b>23,0061</b> |
|              | Mínimo       |            | 38,00      | 11,78          |
|              | Máximo       |            | 97,83      | 41,75          |
|              | Percentiles  | 25         | 48,1150    | 15,0200        |
|              |              | 50         | 82,8050    | 24,8200        |
| 75           |              | 95,1600    | 38,7325    |                |
| Everólimus   | N            | Válidos    | 8          |                |
|              |              | Perdidos   | 0          |                |
|              | <b>Media</b> |            | 83,2475    | <b>30,2813</b> |
|              | Mínimo       |            | 49,43      | 7,30           |
|              | Máximo       |            | 96,39      | 38,54          |
|              | Percentiles  | 25         | 79,7100    | 16,5275        |
|              |              | 50         | 86,9250    | 31,4760        |
| 75           |              | 92,1725    | 36,8550    |                |
| Rapamicina   | N            | Válidos    | 9          |                |
|              |              | Perdidos   | 0          |                |
|              | <b>Media</b> |            | 73,1856    | <b>25,2199</b> |
|              | Mínimo       |            | 53,06      | 10,52          |
|              | Máximo       |            | 90,30      | 39,89          |
|              | Percentiles  | 25         | 58,2100    | 21,4350        |
|              |              | 50         | 73,2400    | 24,1900        |
| 75           |              | 87,2000    | 37,2650    |                |
| Tracólimus   | N            | Válidos    | 14         |                |
|              |              | Perdidos   | 0          |                |
|              | <b>Media</b> |            | 76,4693    | <b>10,0671</b> |
|              | Mínimo       |            | 44,83      | 8,95           |
|              | Máximo       |            | 96,64      | 14,82          |
|              | Percentiles  | 25         | 63,0125    | 8,9600         |
|              |              | 50         | 85,4700    | 10,4250        |
| 75           |              | 88,6525    | 13,2555    |                |

\*Porcentaje sobre linfocitos T CD4+

\*\*Porcentaje sobre linfocitos totales

Los pacientes incluidos en este subestudio presentaron una media de tiempo postrasplante de 7 años. Los mayores tiempos postrasplante se registraron en los 4 trasplantados participantes con ciclosporina. El mayor tiempo postrasplante fue de 10 años. El menor tiempo postrasplante fue de 2 años y se registró en uno de los trasplantados siguiendo una inmunosupresión con everólimus. Todos los trasplantados siguiendo una inmunosupresión con un inhibidor de mTOR se habían cambiado al ImTOR a causa de la nefrotoxicidad de los ICN.

Conviene recordar que estos trasplantados de evolución favorable no tenían cáncer cuando se les incluyó en nuestro estudio.

Todos estos pacientes destacaban por la excelente evolución postrasplante que habían tenido. No obstante, utilizando el Score de Tolerancia Inmunológica Clínica las cosas no eran como parecían.

Obtuvimos más de 18 puntos en el score en 15 de los 35 trasplantados (Figura 7).

- Once de estos 15 pacientes (73%) seguían una inmunosupresión con algún inhibidor de mTOR y cuatro con anticalcineurínicos (Tabla 2).
- Diez de estos 15 trasplantados (67%) presentaron una infección de vías aéreas superiores, presumiblemente viral y sin criterios de hospitalización, que respondió al tratamiento analgésico/antipirético con paracetamol vía oral.
- Los restantes cinco pacientes con puntuación favorable (33%) presentaron una infección urinaria, aislándose en todos los casos *Escherichia coli*, y respondiendo todos éstos satisfactoriamente al tratamiento antibiótico con Zinnat, amoxicilina/ácido clavulánico o ciprofloxacino a las dosis habituales vía oral.

Figura 7.—STIC favorable y desfavorable (Subestudio 1)

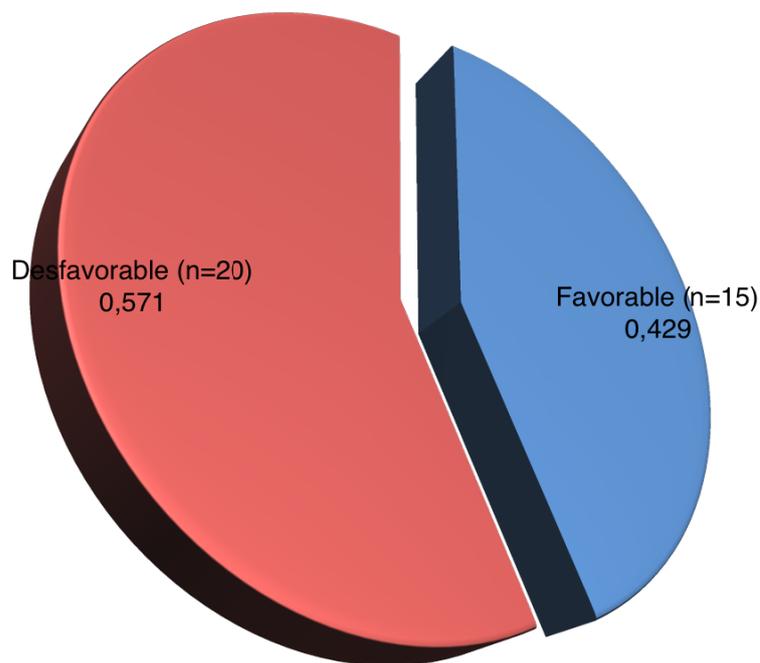


Tabla 2.—Causas de un STIC favorable (Subestudio 1)

|                       | Infecciones urinarias |             | Otras infecciones |             | Cánceres |            | ICN + ImTOR |            |
|-----------------------|-----------------------|-------------|-------------------|-------------|----------|------------|-------------|------------|
| CsA (n = 3)           | 1                     | 33 %        | 2                 | 67 %        | 0        | 0 %        | 0           | 0 %        |
| Tacro (n = 1)         | 1                     | 100 %       | 0                 | 0 %         | 0        | 0 %        | 0           | 0 %        |
| Rapa (n = 6)          | 2                     | 33 %        | 4                 | 67 %        | 0        | 0 %        | 0           | 0 %        |
| Eve (n = 5)           | 1                     | 20 %        | 4                 | 80 %        | 0        | 0 %        | 0           | 0 %        |
| <b>Todos (n = 15)</b> | <b>5</b>              | <b>33 %</b> | <b>10</b>         | <b>67 %</b> | <b>0</b> | <b>0 %</b> | <b>0</b>    | <b>0 %</b> |

Las puntuaciones desfavorables en el STIC llamaron la atención, principalmente por los motivos que yacían detrás de las mismas.

Obtuvimos menos de 18 puntos en el STIC en 20 de los 35 trasplantados (Tabla 3).

- Once de estos 20 pacientes (55%) presentaban aumentos de VSG y/o proteína-C reactiva, 9 de estos 11 (80%) recibían tacrólimus.
- Ocho de estos 20 pacientes (40%) referían haber presentado un evento cardiovascular en el último año, se trató de un Síndrome Coronario Agudo (SCA) sin elevación del ST en todos ellos, el primer evento para 3 de estos 8 pacientes, con tacrólimus 6 de los 8 (75%).
- Seis de estos 20 pacientes (30%) presentaban anemia, 5 de estos 6 (80%) recibían tacrólimus.
- Seis de estos 20 pacientes (30%) presentaban proteinuria, un tercio (2 pacientes) recibían tacrólimus, otro tercio recibían rapamicina y el tercio restante recibían everólimus.
- Finalmente, uno de estos veinte trasplantados con puntuación desfavorable presentaba un hiperparatiroidismo secundario y recibía con tacrólimus.

**Tabla 3.—Causas de un STIC desfavorable (Subestudio 1)**

|                | CsA (n = 1) |       | Tacro (n = 13) |       | Rapa (n = 3) |      | Eve (n = 3) |      | Todos (n = 20) |             |
|----------------|-------------|-------|----------------|-------|--------------|------|-------------|------|----------------|-------------|
| Inflamación    | 1           | 100 % | 9              | 69 %  | 0            | 0 %  | 1           | 33 % | <b>11</b>      | <b>55 %</b> |
| Anemia         | 0           | 0 %   | 5              | 38 %  | 1            | 33 % | 0           | 0 %  | <b>6</b>       | <b>30 %</b> |
| Hiperpara      | 0           | 0 %   | 1              | 8 %   | 0            | 0 %  | 0           | 0 %  | <b>1</b>       | <b>5 %</b>  |
| Aterosclerosis | 0           | 0 %   | 6              | 46 %  | 2            | 67 % | 0           | 0 %  | <b>8</b>       | <b>40 %</b> |
| Baja FG        | 0           | 0 %   | 0              | 0 %   | 0            | 0 %  | 1           | 33 % | <b>1</b>       | <b>5 %</b>  |
| Proteinuria    | 0           | 0 %   | 2              | 15 %  | 2            | 67 % | 2           | 67 % | <b>6</b>       | <b>30 %</b> |
| ICN            | 1           | 100 % | 13             | 100 % | 0            | 0 %  | 0           | 0 %  | <b>14</b>      | <b>70 %</b> |
| Rechazo        | 0           | 0 %   | 0              | 0 %   | 0            | 0 %  | 0           | 0 %  | <b>0</b>       | <b>0 %</b>  |

Se tomaron todas las medidas que se creyó oportunas para tratar aquellas situaciones que contribuían a una puntuación desfavorable en el Score de Tolerancia Inmunológica Clínica, puesto que estas situaciones teóricamente predisponían al rechazo.

- Intensificación del tratamiento esteroideo en los pacientes que presentaban marcadores de inflamación en la analítica,
- Ante el mal control tensional (cifras mayores de 140/90 según las recomendaciones ESH/ESC 2013), se ajustó el tratamiento hipotensor, con especial énfasis en el empleo de inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina, inhibidores de los receptores de angiotensina-II y calcioantagonistas no dihidropiridínicos, por sus efectos anti-proteinuria fundamentalmente.
- No se creyó pertinente disminuir la dosis del inhibidor de mTOR para los casos de proteinuria que se pensó asociada a estos medicamentos.
- Para los casos de mal control de los lípidos, se aumentó la dosis de estatinas y se prescribió en un paciente la asociación de simvastatina con ezetimibe.
- Verificación de la anti-agregación en los pacientes que habían referido un SCA.
- Ajustes en el tratamiento de la anemia que incluyeron prescripción de hierro intravenoso y aumento de la dosis del AEE (Darbepoetina alfa).
- En el paciente con hiperparatiroidismo secundario se cambió el calcitriol que seguía por paricalcitol.

Posteriormente, uno de los trasplantados con ciclosporina, con Tregs de 10.78% y puntuación desfavorable en el STIC, presentó un rechazo agudo celular, y uno de los trasplantados con everólimus, con Tregs de 7.30% y puntuación desfavorable también, presentó una glomerulopatía del trasplante.

## 5.1.2 Subestudio 2

Concerniendo al Subestudio 2, la media y la mediana de los porcentajes de Tregs en los trasplantados con cáncer e infectados fue de 32.5% y 31.8% respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4.— Enfermedades y porcentajes de Tregs (Subestudio 2)

| Enfermedad                                   | Tregs (%) |
|--|-----------|
| <b>Rabdomiosarcoma retroperitoneal</b>       | 28,59     |
| <b>Leucemia linfática crónica</b>            | 31,67     |
| <b>Leucemia aguda promielocítica</b>         | 30,05     |
| <b>Pielonefritis aguda por E. coli</b>       | 29,16     |
| <b>Pielonefritis aguda por K. pneumoniae</b> | 30,97     |
| <b>Enfermedad por CMV</b>                    | 31,89     |
| <b>Parotiditis</b>                           | 32,44     |
| <b>Tuberculosis</b>                          | 34,65     |
| <b>Herpes Zoster</b>                         | 33,97     |
| <b>Herpes Zoster</b>                         | 35,56     |
| <b>Varicela</b>                              | 38,88     |

Si factores inmunológicos y no inmunológicos eran capaces de tener un gran efecto sobre la variable Tregs, estadísticamente la asunción de normalidad no podía justificarse para la repartición de frecuencias en la cohorte de trasplantados con cánceres e infecciones. Apoyó esta presunción la gran variabilidad inter-individual en el contingente CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> CD127<sup>-</sup>, si bien éste no formó parte de la variable Tregs.

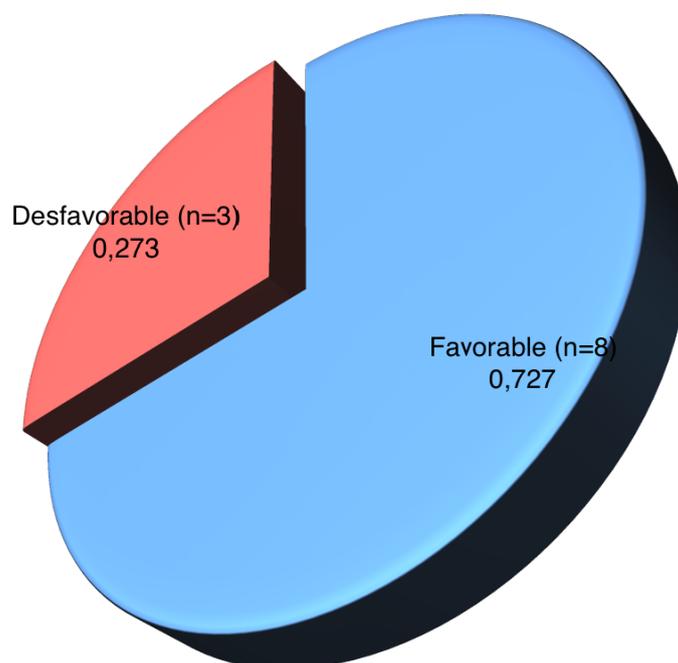
Calculado el valor del ratio Tregs / Tefecs, el más bajo fue de 1.1 y el más alto de 1.4, correspondiendo a las pielonefritis por *E. coli* y *K. pneumoniae* respectivamente.

Los trasplantados incluidos en este subestudio presentaron una media de tiempo postrasplante de: 5 años los trasplantados con cáncer y 2 años los trasplantados infectados.

Todos estos pacientes se encontraban siguiendo una inmunosupresión con inhibidores mTOR durante un año por lo menos cuando se les diagnosticó de su neoplasia o su infección, y todos menos uno se habían cambiado a estos medicamentos a causa de la nefrotoxicidad de los anticalcineurínicos.

Obtuvimos una puntuación desfavorable en el STIC en 3 de estos 11 trasplantados (Figura 8). Ninguno desarrolló rechazo.

**Figura 8.—STIC favorable y desfavorable (Subestudio 2)**



Las patologías fueron tratadas y seguidas según correspondía. Los aportes de otros médicos especialistas, incluso los que abogaban por la suspensión de toda inmunosupresión, no se menospreciaron a la hora de la toma de decisiones.

### **5.1.3 Predicción de la propensión al rechazo del aloinjerto**

#### **CASO DE UN RECHAZO AGUDO**

Uno de los trasplantados de buena evolución presentó un evento de rechazo. Se trató de varón de 77 años, con ERC por nefroangiosclerosis, trasplantado hacía 10 años, y con ciclosporina a niveles en rango.

En la consulta el paciente se encontraba asintomático. Presentaba una creatinemia de 1.5mg/dL. Tregs de 10.78%. Diez puntos en el score por presentar VSG y proteína-C reactiva elevadas, y por seguir una inmunosupresión con anticalcineurínicos.

Tres semanas más tarde, el paciente presentaba un deterioro agudo de la función del injerto, a pesar de la intensificación de la corticoterapia emprendida, sin necesidad de hemodiálisis. La biopsia revelaba un rechazo agudo celular que respondió a los esteroides a fuertes dosis (6 bolos de 250mg de 6-metil-prednisolona diarios).

## CASO DE UN RECHAZO CRÓNICO

Otro de los trasplantados de buena evolución presentó un rechazo crónico. Se trató de un varón de 55 años, con ERC por uropatía obstructiva en el contexto de un reflujo vésico-ureteral, trasplantado hacía 4 años, y siguiendo una inmunosupresión con everólimus. La función del injerto había sido normal hasta el momento de la consulta.

El paciente refería edemas maleolares, que en un primer momento se atribuyeron al tratamiento con everólimus. Tregs de 7.30%. Once puntos en el score por presentar descenso en el aclaramiento de creatinina (35% por MDRD-4), sumado a una proteinuria de 0.7gr/día, y por una hipergammaglobulinemia policlonal.

Dos meses más tarde, a pesar de los cambios en el tratamiento que se juzgó pertinentes, ingresó porque su creatinina había aumentado de 1.7mg/dL a 3.2mg/dL, la proteinuria alcanzaba los 4gr/día y persistía todavía la hipergammaglobulinemia policlonal observada al inicio. La biopsia reveló una glomerulopatía del trasplante con un escaso componente de lesiones agudas.

## **5.1.4 Predicción de la propensión a cánceres e infecciones en el postrasplante**

### **TOLERANCIA Y PROPENSIÓN AL RECHAZO**

Los pacientes del rhabdomioma, la enfermedad por CMV y el caso de la tuberculosis fueron los que presentaron una puntuación desfavorable en el STIC.

El caso del rhabdomioma, se trató de una mujer de 41 años, con ERC de etiología no filiada, que había recibido su primer trasplante hacía 3 años. Había presentado un carcinoma papilar de tiroides un año después de trasplantarse, por lo que se había cambiado el tacrólimus que seguía por everólimus. La función del injerto había sido normal hasta el momento de la consulta.

La paciente refería un adelgazamiento pertinaz de alrededor de 20kg en 4-6 meses y un dolor abdominal difuso. En la exploración física destacaba una esplenomegalia de dos traveses de dedo. La ecografía mostró una gran masa intraesplénica de aproximadamente 14 cm, heterogénea y mixta hipo- e hiper-ecoica, que se confirmó luego con el scanner, que a su vez mostró otras dos masas de las mismas características, pre-injerto y de la pared rectal ocupando el espacio pre-sacro; todas éstas dependientes del retroperitoneo. La anatomía patológica reveló un rhabdomioma retroperitoneal.

Tregs de 28.59%. Diecisiete puntos en el score por presentar descenso en el aclaramiento de creatinina (55% por MDRD-4), además de una proteinuria de 1.3gr/día, y por una VSG de 100mm acompañada de una hipergammaglobulinemia policlonal.

Tras quimioterapia citorreductora, se le propuso la exéresis de sus sarcomas. La paciente presentaba esta segunda neoplasia manteniendo una inmunosupresión con un ImTOR y la propuesta para suspender la misma no tardó en llegar de parte del equipo de cirujanos y oncólogos que seguían a la paciente. Finalmente, en sesión clínica la decisión fue de disminuir la dosis pero no de suspender el ImTOR, y por supuesto de no volver al anticalcineurínico.

El caso de la enfermedad por CMV, se trató de una mujer de 63 años, con ERC de etiología no filiada, que había recibido su primer trasplante hacía 6 meses. Se conocía una serología CMV positiva desde el pretrasplante. Sin constancia de función retrasada en el postrasplante inmediato, la función del injerto había sido normal hasta el momento de la consulta.

Ingresó por un cuadro viral, pero rápidamente necesitó ser trasladada a la Unidad de Cuidados Intensivos, por fallo multiorgánico complicando su neumonitis y diarrea, necesitando de intubación y de hemodiafiltración veno-venosa continua. La antigenemia confirmó la sospecha de enfermedad por CMV.

Tregs de 31.89%. Diecisiete puntos en el score por la pérdida aguda del aclaramiento (90% por MDRD-4), agregada a una proteinuria persistente de 1gr/día, y por una proteína-C reactiva muy elevada y una hipergammaglobulinemia policlonal.

Entre el conjunto de medidas emprendidas, se decidió cambiar el everólimus que seguía por tacrólimus.

Ya sin ningún tipo de respuesta a las aminos vasoactivas, la paciente falleció 72 horas.

El caso de la tuberculosis, se trató de un varón de 78 años, conocido por su insuficiencia cardiaca isquémico-hipertensiva, con ERC de etiología no filiada, que había recibido su primer trasplante hacía 2 meses. Sin función del injerto en el postrasplante inmediato, necesitó de hemodiálisis. La creatinemia antes de la consulta era de 2.3-2.5mg/dL.

Estando aún hospitalizado tras haber sido trasplantado, se le diagnosticó de la reactivación de una tuberculosis que había padecido en la infancia. Se asoció un empeoramiento de su insuficiencia cardíaca de base tras entrar en FA, lo que contribuyó a deteriorar la mediocre función de su injerto, y a requerir nuevamente de hemodiálisis.

Tregs de 34.65%. Diecisiete puntos en el score por la pérdida del FG (85% por MDRD-4), por la proteinuria de 0.8gr/día y por la VSG de 100mm.

Como parte de las medidas emprendidas, en este caso también se decidió cambiar el everólimus por tacrólimus.

Con mala tolerancia hemodinámica a la hemodiálisis, falleció tras parada cardio-respiratoria intra-diálisis.

Ninguno de estos tres pacientes presentó rechazo.

## CURSO MÁS LENTO DE LAS INFECCIONES

Mencionamos las dos pielonefritis. Una de ellas la presentó un varón de 45 años, de raza gitana, con antecedentes de Hepatitis C y ERC por poliquistosis hepatorrenal. La otra la presentó también un varón, de 57 años, con ERC por nefroangiosclerosis. Estos pacientes habían presentado hacía 2 años y 1 año respectivamente otro episodio de infección urinaria.

Tregs de 29.16% y 30.97% respectivamente. Aunque las puntuaciones en el score fueron favorables, ambos presentaban PCR elevada y proteinuria en torno a 0.5-0.6gr/día. Ninguno de estos dos pacientes presentó deterioro de la función del injerto.

Estas pielonefritis respondieron lentamente al tratamiento antibiótico con ceftazidima 2gr/8 horas vía intravenosa, que se decidió suspender y cambiar a piperacilina/tazobactam 4gr/8 horas vía intravenosa ante la persistencia de la fiebre y los cultivos negativos una semana después de haber iniciado el primer antibiótico. Ambos pacientes continuaron posteriormente al alta con Zinnat 500mg/12 horas vía oral durante 15 días.

## OTRAS OBSERVACIONES

El caso de la parotiditis se trató de un contagio en el contexto de una epidemia registrada en la ciudad en 2012; se trató de un universitario, de 21 años de edad, con ERC por un síndrome nefrótico de tipo finlandés.

El caso de la varicela se trató de una primo-infección por el VZV, y no de un zoster múlti-dermatoma como se sospechó al inicio, que sorprendió por su excelente evolución; se trató de una mujer de 35 años de edad, con ERC por reflujo vésico-ureteral.

Junto a los otros casos, de la leucemia linfática crónica, la leucemia aguda promielocítica, y los dos herpes zoster, todos presentaron una función del injerto normal.

## 5.2 Análisis comparativo

### 5.2.1 Umbrales de Tregs en trasplantados y controles sanos

La distribución de frecuencias para la variable Tregs (nTregs + células Th3) fue normal (curva gaussiana) en el conjunto de controles sanos y en los trasplantados renales de evolución favorable.

La repartición de las frecuencias observada en los controles sanos ( $21.4 \pm 17.6\%$ ) no fue significativamente diferente ( $p=0.57$ , prueba del Chi-cuadrado) respecto a aquella de los pacientes trasplantados de buena evolución ( $22.1 \pm 14.8\%$ ).

2 de los 15 participantes sanos (13.3%) tenían un valor inferior a aquel considerado como el más bajo en los trasplantados renales de evolución favorable.

La media y la mediana de los porcentajes de Tregs en los trasplantados con cánceres e infecciones fue de 32.5% y 31.8% respectivamente, pero no se compararon a estos trasplantados con los controles sanos, o con los trasplantados de buena evolución.

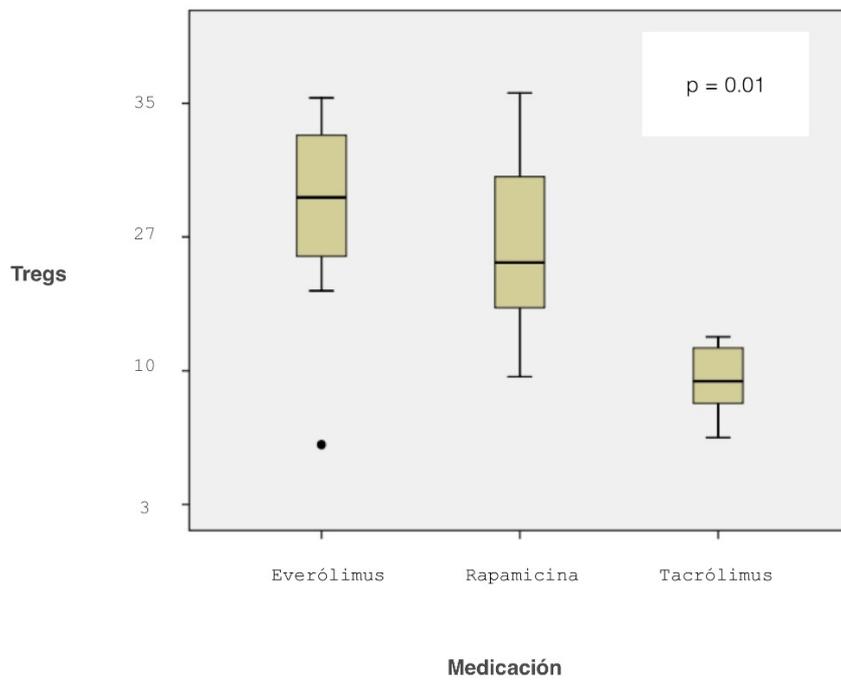
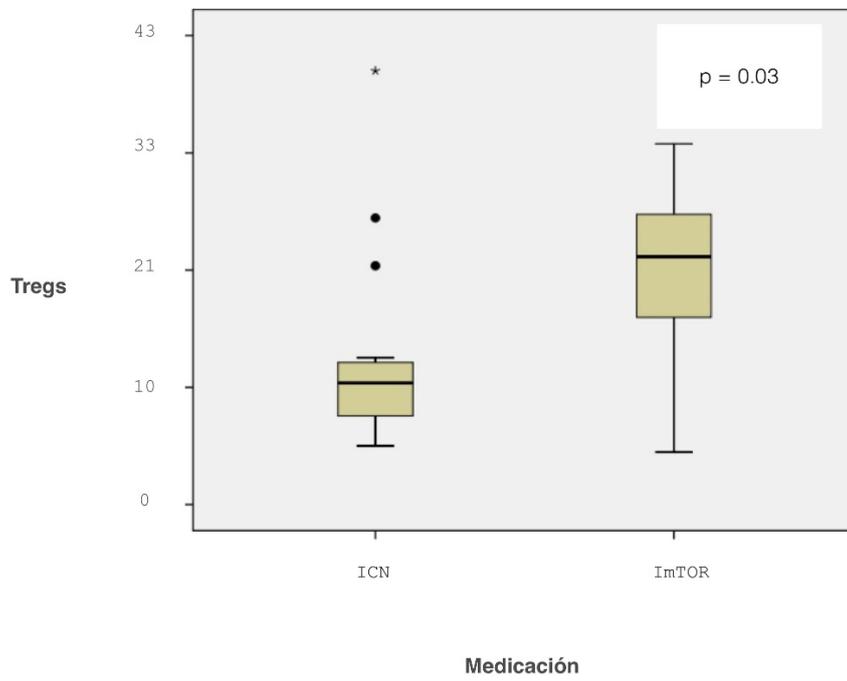
## **5.2.2 Porcentajes de Tregs con anticalcineurínicos e inhibidores de mTOR**

Los porcentajes de células T reguladoras eran mas elevados en los trasplantados con inhibidores de mTOR que en los trasplantados con anticalcineurínicos ( $p=0.03$ , prueba de la U de Mann-Whitney) (Figura 9).

Los pacientes tratados con ciclosporina ( $n=4$ ) tenían porcentajes de Tregs elevados, comparables a aquellos con inhibidores de mTOR, pero éstos no se consideraron al comparar a los subgrupos de inmunosupresores entre si, por el restringido número de pacientes tratados con este inmunosupresor.

La frecuencia de células Treg en los trasplantados tratados con tacrólimus era significativamente diferente de aquella en los trasplantados con inhibidores de mTOR ( $p=0.01$ , prueba de la U de Mann-Whitney) o aún de aquellas con rapamicina o everólimus evaluadas por separado ( $p=0.01$ , prueba de la H de Kruskal-Wallis) (Figura 9).

Figura 9.—Diferencias significativas entre anticalcineurínicos e inhibidores de mTOR



# 6. Discusión



## 6. Discusión

Lo esencial de nuestro trabajo se basa en el conteo de las células T reguladoras y la medición del impacto de las correlaciones clínicas de la dinámica de la población F<sub>oxp3</sub><sup>+</sup>. Hemos buscado desarrollar una estrategia de inmuno-vigilancia clínica para el seguimiento del trasplantado renal.

El interés teórico del inmunocontrol clínico es esquemáticamente triple.

- Utilizar la información aportada por la cuantificación de las células T reguladoras para predecir:
  - A. Globalmente, la evolución del trasplante en términos de supervivencia o de función del injerto (creatinemia y/o aclaramiento de creatinina) ;
  - B. Específicamente, los eventos clínicos que ensombrecerán el curso normal del trasplante (función retardada, rechazo agudo, nefropatía crónica del injerto).
- Prevenir, con la ayuda de las correlaciones clínicas de la dinámica de la población Treg, las complicaciones asociadas a la inmunosupresión como los cánceres, las infecciones, la nefrotoxicidad y el empeoramiento de una aterosclerosis preexistente.

- Permitir próximamente la elaboración de los protocolos de inducción de tolerancia alo-específica preservando en todo momento una respuesta antitumoral y anti-infecciosa eficaz.

## 6.1 Puesta a punto de la determinación de Tregs

Las células T reguladoras juegan un rol mayor en el control de la respuesta inmune adaptativa. Un esfuerzo considerable se ha realizado en consecuencia, para entender mejor su fisiología y diseccionar su papel en patología. Existen dos categorías de Tregs que difieren por su origen, fenotipo, plasticidad, modo de acción y por las modificaciones epigenéticas a nivel del locus *Foxp3*. La contribución de las células T nativas circulantes, que pueden adquirir el fenotipo regulador, es en este sentido decisiva.

La puesta en evidencia de que el triple marcaje de membrana CD4/CD25/CD127 permite caracterizar las células T reguladoras *Foxp3*<sup>+</sup> (nTregs e iTregs conjuntamente) [109, 110] autoriza teóricamente el seguimiento rutinario del conjunto de Tregs de los pacientes trasplantados. Sin embargo, el estudio de la "semiología" de la dinámica de las subpoblaciones linfocitarias reguladoras como medio para predecir la evolución del trasplante y los eventos clínicos negativos del postrasplante son tan importantes como el análisis fiable de estas subpoblaciones. Numerosas situaciones se conocen mal todavía y

carecen de marcadores diagnósticos o pronósticos para un seguimiento de la capacidad supresora de los Tregs en la clínica [111-114].

Analizar una población tan compleja con sólo tres parámetros parecía de una extremada simpleza y podía explicar la falta de interés de los nefrólogos que se dedican al trasplante por este análisis en mención de potenciales sesgos.

La validación del conteo de las subpoblaciones linfocitarias reguladoras circulantes exige el examen de la calidad y performance de la técnica. El conteo de linfocitos Treg mediante triple marcaje utilizando el sistema FACSCalibur (BD Biosciences) es robusto y reproducible, y mantiene unos coeficientes de variabilidad inferiores a 10%. Además, parece que caracteriza adecuadamente al conjunto de nTregs e iTregs. Propusimos en consecuencia utilizar este método, por su precisión, su fiabilidad, y por estar muy acorde con las recomendaciones internacionales para obtener una buena continuidad de los resultados en el seguimiento de los pacientes.

La importancia del seguimiento del conteo de los linfocitos T reguladores en trasplante renal incita a una estandarización de la técnica para permitir una buena precisión y reproductibilidad, en el tiempo y entre laboratorios. Sin embargo, considerando el número de posibilidades para la identificación de linfocitos Treg en citometría, las diferencias significativas entre las soluciones propuestas a día de hoy por las diferentes compañías concerniendo los controles de calidad, las diferencias entre los marcajes de membrana e intra-celular Foxp3 debido a la expresión inestable de Foxp3 por los iTregs, y las recomendaciones de cuantificar al conjunto de nTregs e iTregs, las tentativas para llegar a una estandarización de la técnica son difíciles de entender.

Analizamos la proporción de células T reguladoras provenientes de 35 trasplantados renales de evolución favorable y "saludables", 3 trasplantados con cáncer, 8 trasplantados infectados y 15 controles sanos.

Consideradas las posibles causas de artefactos y siguiendo las indicaciones de BD Biosciences se visualizaron dos subpoblaciones linfocitarias CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> diferentes según el nivel de expresión de CD127, siendo reducido en las células T reguladoras (nTregs + células Th3) comparado a las células T activadas o efectoras.

En Valladolid había un interés manifiesto de parte de los nefrólogos para identificar las células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> CD127<sup>-</sup>, considerando que el 25% de las células exponiendo este fenotipo eran auténticas células T reguladoras Foxp3<sup>+</sup> [109, 110]. Hemos observado una gran variabilidad inter-individual en este contingente. Como sugerido por otros [56, 82, 151, 155, 156], ¿era esta la huella de la influencia micro-ambiental (inflamación, inmunosupresión) sobre la diversidad y la dinámica de los Tregs? Sin recurso al marcaje intra-celular Foxp3, la identificación de las células Tr1 sería accesible con ayuda del triple marcaje de membrana CD4/CD25/CD127, dividiendo entre cuatro los valores de la proporción obtenidos de células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> CD127<sup>-</sup>.

Cabe recordar que los porcentajes obtenidos del contingente CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> CD127<sup>-</sup> no fueron considerados en la variable Tregs.

La distribución de frecuencias para la variable Tregs (nTregs + células Th3) de los controles sanos y los trasplantados renales de evolución favorable sigue la ley de Laplace-Gauss. La repartición de las frecuencias observada en los controles sanos (21.4±17.6%) no fue significativamente diferente (p=0.57, prueba del Chi-cuadrado)

respecto a aquella de los pacientes trasplantados de buena evolución ( $22.1 \pm 14.8\%$ ). 2 de los 15 participantes sanos (13.3%) tenían un valor inferior a aquel considerado como el más bajo en los trasplantados renales de evolución favorable. La media y la mediana de los porcentajes de Tregs en los trasplantados con cáncer e infectados fue de 32.5% y 31.8% respectivamente, pero no encontramos ninguna posibilidad de comparación entre estos trasplantados y los controles sanos o los trasplantados de buena evolución.

Hemos demostrado que fue posible el análisis de la población Treg mediante citometría de flujo y triple marcaje de membrana para el seguimiento de las subpoblaciones linfocitarias reguladoras circulantes de los trasplantados renales.

Hemos buscado definir los umbrales de normalidad para las células T reguladoras en los trasplantados renales seguidos en la Unidad de Trasplante Renal del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, considerando el monoclonal elegido, el sistema, etc. Los umbrales de normalidad de Tregs (nTregs e iTregs) quedan establecidos de 7% a 35%, éstos probablemente sean los mismos en la población general no trasplantada.

## 6.2 Comparando a los anticalcineurínicos con los inhibidores de mTOR

En el último decenio, el estudio del impacto de los fármacos inmunosupresores en la dinámica de la población Treg se hace primordial. Se entiende de sobra el efecto

negativo de los inhibidores de la calcineurina en la biología de los Tregs por diversos mecanismos, sobre todo por la reducción de la cooperación entre NFAT y los factores de transcripción de Foxp3 [157], y por el bloqueo de la secreción de IL-2 [158]. La limitación de la exposición a estos medicamentos es una alternativa pero no parece suficiente en el tiempo. Contrariamente, los inhibidores de mTOR favorecen probablemente la supervivencia y función de los Tregs [149, 161, 164] pero pruebas claras de un efecto benéfico de estos medicamentos se echan en falta debido a efectos ambivalentes pro-tolerancia y pro-inflamatorio [165].

El Servicio de Nefrología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid trasplanta desde 1995 y realiza entre 50 y 60 implantes de riñón cada año. Nuestro tratamiento inmunosupresor comprende la asociación de un anticalcineurínico (usualmente tacrólimus) con un derivado del ácido micofenólico y esteroides (antecedentes de inmunización, segundos o ulteriores trasplantes, injertos "marginales", etc). Para reforzar el nivel global de la inmunosupresión, un un tratamiento de inducción con un anti-receptor de interleuquina-2 se prescribe al inicio. Ello permite una introducción de los anticalcineurínicos nefrotóxicos a dosis reducidas. El lugar de los inhibidores de mTOR se encuentra todavía mal codificado. Las estrategias de conversión consistentes en disminuir progresivamente las dosis de anticalcineurínicos hasta su interrupción y reemplazar esta clase de inmunosupresores por otros no nefrotóxicos, un inhibidor de mTOR lo más frecuentemente, en los pacientes con función renal estable, sugieren que el beneficio principal de la interrupción de los anticalcineurínicos y de una conversión tardía a inhibidores de mTOR es una disminución significativa y precoz de la incidencia de cánceres. Por otra parte, la interrupción precoz de los anticalcineurínicos y su reemplazo por inhibidores de mTOR conlleva cierto una mejora de la función del injerto pero al precio de un aumento de la incidencia de rechazo agudo. Finalmente, en los estudios de

conversión en pacientes presentando disfunción crónica del injerto, el remplazo precoz de tacrólimus por un ImTOR estabiliza o mejora la función renal.

En Valladolid como en otros sitios, los límites actuales de la inmunosupresión son la ausencia de eficacia sobre el rechazo crónico, una eficacia menor sobre el rechazo humoral que sobre el rechazo celular, y su toxicidad global y sobre todo renal. El aumento del nivel de una inmunosupresión poco específica y las propiedades intrínsecas de ciertas drogas favorecen la aparición de cánceres después del trasplante. Este riesgo es tanto más importante que la población de receptores envejece y se encuentra expuesta en mayor medida al riesgo de cáncer. Además, el número de pacientes inmunizados de alto riesgo inmunológico a la espera de un trasplante aumenta y la utilización de injertos "marginales", particularmente sensibles a la nefrotoxicidad de los inmunosupresores, es cada vez más corriente en un periodo de penuria de órganos.

Adaptar lo mejor posible los tratamientos inmunosupresores con el doble objetivo de limitar su toxicidad e individualizar su posología, considerando el espectro terapéutico estrecho de algunas drogas, sin llevar a un aumento de la incidencia de rechazo agudo, no parece entonces fácil.

Las estrategias de inducción de tolerancia tienen por objeto obtener la interrupción de la inmunosupresión después del trasplante en razón de una tolerancia específica del receptor frente al donante. La disminución de la toxicidad de las diferentes drogas es evidentemente un beneficio considerable además de la desaparición de las manifestaciones de súper-inmunosupresión que son los cánceres y las infecciones. En consecuencia, en los objetivos de poder inducir un estado de "tolerancia inmunitaria operacional", se recomienda la continuación de los esfuerzos para el desarrollo de

estrategias permitiendo la inducción de tolerancia del alo-injerto y la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares que la sostienen. Una incitación, por medios consecuentes, al desarrollo de nuevos marcadores inmunológicos permitiendo seguir un estado de tolerancia inmunitaria (inmunosupresión) es necesaria. La promoción de protocolos de minimización de la inmunosupresión como etapa previa y éticamente aceptable a protocolos más ambiciosos de interrupción completa de la inmunosupresión debe pasar por la realización de estudios previos que permitan la disección fina de los puntos de impacto de los medicamentos inmunosupresores respecto la inducción de tolerancia.

Estuvimos interesados en verificar las diferencias entre los inhibidores de la calcineurina y los inhibidores de mTOR concerniendo la promoción de tolerancia. Estudiamos una cohorte de 35 pacientes trasplantados renales de evolución favorable y "saludables" (sin antecedentes de rechazo, sin hiperinmunización, sin cáncer, sin infección), y sin Enfermedad Renal Crónica de causa inmunológica incluida la diabetes.

Los pacientes participantes conformaron dos grupos: anticalcineurínicos (n=18) e inhibidores de mTOR (n=17). Los tratamientos adyuvantes como los corticoides, la azatioprina o los derivados del ácido micofenólico no fueron considerados.

Observamos que los porcentajes de células T reguladoras eran mas elevados en los trasplantados con inhibidores de mTOR que en los trasplantados con anticalcineurínicos (p=0.03, prueba de la U de Mann-Whitney). Observamos que los pacientes tratados con ciclosporina (n=4) tenían porcentajes de Tregs elevados, comparables a aquellos con inhibidores de mTOR, pero estos resultados no fueron considerados concluyentes en vista del restringido número de pacientes tratados con este

inmunosupresor. La frecuencia de células Treg en los trasplantados tratados con tacrólimus era significativamente diferente de aquella en los trasplantados con inhibidores de mTOR ( $p=0.01$ , prueba de la U de Mann-Whitney) o aún de aquellas con rapamicina o everólimus evaluadas por separado ( $p=0.01$ , prueba de la H de Kruskal-Wallis).

Existen diferencias entre los inhibidores de la calcineurina y los inhibidores de mTOR respecto a la frecuencia de células T reguladoras, siendo ésta más elevada con inhibidores de mTOR, lo que no significa necesariamente inmunotolerancia.

La información que podamos obtener de la clínica es por lo tanto esencial para intentar responder a la pregunta importante de saber si los inhibidores de mTOR son ciertamente eficaces para estimular una tolerancia de la respuesta inmune. Sin lugar a dudas es útil – pero insuficiente – seguir las subpoblaciones linfocitarias reguladoras en los pacientes trasplantados renales. Siendo un requisito para los protocolos de inducción de tolerancia alo-específica que demandan la interrupción de todo tratamiento inmunosupresor, el aporte de la clínica verifica los resultados de la optimización y la individualización de la inmunosupresión después de la eliminación de las drogas peor toleradas (anticalcineurínicos y esteroides), y esto con el doble objetivo de combatir su toxicidad y de inducir tolerancia.

## 6.3 Expresión clínica de la dinámica de la población Treg

### 6.3.1 Prevención del rechazo del alo-injerto

La constitución de la población linfocitaria Treg se encuentra en dinámica permanente y resulta de la expansión y contracción de las dos clonas de linfocitos T reguladores, bajo la influencia de condiciones exteriores y reglas de homeostasis.

La implicación creciente de las células T reguladoras Foxp3<sup>+</sup> en trasplante obliga a entender mejor los diferentes mecanismos que gobiernan su número, direccionamiento, interacciones y función. A este respecto, numerosas correlaciones clínicas se encuentran descritas, testimonio del impacto de una regulación de la respuesta inmune. El desarrollo de scores pronósticos que permitan cuantificar este impacto traducido en términos de supervivencia del trasplante y/o del trasplantado es indispensable y su validación en cohortes importantes de pacientes, de centros o mejor de países diferentes, decisivo para mejorar los resultados a largo plazo.

La creación del Score de Tolerancia Inmunológica Clínica desarrollado por un equipo de nefrólogos e inmunólogos del Hospital Necker de Paris, busca la aplicación de todos los correlatos clínicos de los Tregs con el fin de desarrollar una actitud preventiva contra el rechazo del alo-injerto. Un esfuerzo considerable para validar este score se lleva

a cabo con la participación de los hospitales franceses de Tours y Saint-Étienne, Clínicas Universitarias Saint-Luc de Bruselas (Bélgica), Centro Hospitalario Universitario Valdense y Hospitales Universitarios de Ginebra en Suiza, y Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

A pesar de los progresos innegables, el trasplante de órganos se enfrenta al obstáculo que representa el sistema inmunitario del receptor que pone en marcha y coordina una serie de mecanismos destinados a destruir el injerto no reconocido como propio. Si la respuesta inmune juega un rol capital en el rechazo, múltiples mecanismos celulares y moleculares condicionan el futuro del injerto.

Para controlar las diferentes formas de rechazo, desde hace 40 años, un largo panel de inmunosupresores se ha desarrollado. Conjugada a la optimización de las técnicas quirúrgicas y métodos de conservación, la inmunosupresión ha permitido aumentar considerablemente la supervivencia de los injertos.

No obstante, los inmunosupresores presentan numerosos inconvenientes. Lo extendido de la distribución tisular de sus blancos lo mismo que su naturaleza molecular entrañan efectos iatrogénicos mayores. La inmunosupresión generalizada altera los mecanismos de inmunovigilancia, aumentando la frecuencia de infecciones y cánceres tanto como la morbilidad que les es asociada. Los tratamientos inmunosupresores, eficaces para luchar contra el rechazo agudo, tienen poco efecto sobre la alorreactividad crónica una vez instaurada una nefropatía del trasplante. Frente a estas limitaciones, la comunidad científica trata de desarrollar estrategias que induzcan una tolerancia del injerto es decir, un estado de hiporrespuesta inmunológica específica de los alo-antígenos, mientras que son preservadas las reacciones inmunitarias específicas frente a

antígenos extraños o tumorales. Hablamos de "tolerancia operacional", una situación en la que se constata una supervivencia funcional del injerto a largo plazo en ausencia de inmunosupresión crónica. Esta definición, totalmente válida en el contexto experimental, debe sin embargo retocarse si se desea transferirla a la clínica donde aparece difícil, casi imposible, "reprogramar" las funciones del sistema inmunitario para que reconociendo a los alo-antígenos no genere contra ellos reacción "agresiva" alguna. En el animal, diferentes estrategias han permitido llegar a obtener una tolerancia operacional. Diversos problemas, de orden práctico y ético, han impedido hasta ahora transferir a la clínica estas estrategias que tienen por fin último la suspensión total de todo tratamiento inmunosupresor.

El rechazo agudo es un problema mayor en trasplante de órganos sólidos porque este rechazo puede conducir a una pérdida de la función del injerto, aguda o crónica. En Valladolid (datos no publicados) la incidencia de rechazo agudo celular y humoral de 5% y 7% respectivamente. El primer episodio de rechazo agudo sobreviene frecuentemente en los tres primeros meses que siguen al trasplante pero puede sobrevenir en todo momento de la vida del trasplantado, aún cuando la adherencia al tratamiento es satisfactoria.

Si el órgano trasplantado sobrevive al rechazo agudo, las funciones del injerto pueden aparecer normales durante un periodo más o menos largo. Una disfunción crónica se instala paulatinamente en alrededor de 50% de estos pacientes trasplantados renales. Desde inicios de los años 80, la supervivencia a un año de los injertos renales ha aumentado de manera muy significativa, alcanzando actualmente más del 90%. Sin embargo, los resultados a largo plazo han cambiado poco y sobre todo el porcentaje de injertos perdidos cada año después del primer año postrasplante no ha evolucionado.

Cualquiera sea el órgano considerado, el tratamiento del rechazo reposa antes que todo en la prevención y después en el tratamiento curativo en caso de insuficiencia de esta prevención. La prevención del rechazo se basa en un tratamiento inmunosupresor, adaptado al riesgo "inmunológico" (antecedentes de inmunización por transfusión, trasplantes previos...) del receptor. La continuación del esfuerzo para el desarrollo de estrategias de promoción de un control inmunológico sistemático de la respuesta inmune de los pacientes trasplantados por una organización en red centrada en los laboratorios de Inmunología teniendo experiencia en trasplante es esencial. El desarrollo de tests no invasivos basados en métodos sensibles y específicos es altamente prioritario para la vigilancia del estatus inmunológico del trasplante.

A día de hoy, no es suficiente conocer el porcentaje de células reguladoras de los trasplantados renales para ser capaces de emitir un juicio certero acerca del estado de tolerancia frente al injerto. Las correlaciones clínicas de la dinámica de los Tregs mejoran el seguimiento del conteo del conjunto circulante de estas células y permiten el desarrollo de un inmunocontrol clínico del trasplantado renal.

Prevenir y limitar la nefrotoxicidad engendrada por los inhibidores de la calcineurina responde a las exigencias solicitadas a los scores de riesgo. La nefrotoxicidad tiene consecuencias deletéreas cualquiera sea el órgano trasplantado. Este efecto se traduce en el plan clínico por una insuficiencia renal aguda o crónica que tarde o temprano lleva al fracaso de la maquinaria tolerógena.

El riesgo de efectos secundarios de los medicamentos inmunosupresores es tanto más importante que la población de receptores envejece y expone una acumulación de factores de riesgo explicando el aumento de complicaciones cardiovasculares y

dismetabólicas en el mediano y largo plazo. Predecir las complicaciones cardiovasculares en pacientes que presentan una prevalencia de factores de riesgo cardiovascular muy elevada y en quienes la contribución de los tratamientos inmunosupresores a estos factores de riesgo es mayor, representa un punto de reflexión importante en la elaboración de estrategias de inmuno-vigilancia destinadas a prevenir el rechazo. Los linfocitos T reguladores disminuyen la progresión de la aterosclerosis y ejercen efectos anti-aterogénicos.

Buscamos interpretar los porcentajes de células reguladoras con ayuda del Score de Tolerancia Inmunológica Clínica en los 46 trasplantados renales incluidos en nuestro estudio.

Obtuvimos un score favorable (más de 18 puntos) en 15 de los 35 trasplantados renales de evolución favorable, de los que once seguían una inmunosupresión con un inhibidor de mTOR y cuatro con anticalcineurínicos. Sesenta y seis por ciento (10 pacientes) presentaron una infección de vías aéreas superiores, sospechosa de ser viral y sin criterios de hospitalización. Treinta y tres por ciento (5 pacientes) presentaron una infección urinaria, de evolución favorable también y que fue tratada con Zinnat, amoxicilina/ácido clavulánico o ciprofloxacino.

Conviene recordar que estos trasplantados de evolución favorable no tenían cáncer cuando se les incluyó en nuestro estudio.

No incluimos tampoco ningún trasplantado recibiendo una asociación de inhibidores de la calcineurina con inhibidores de mTOR. De esta manera, para una correcta utilización del score, decidimos sumar los seis puntos para el ítem de

tratamientos no nefrotóxicos siempre que el trasplantado seguía una inmunosupresión con un inhibidor de mTOR.

En Valladolid, la asociación de anticalcineurínicos con inhibidores de mTOR no es una práctica corriente. A finales de 2012, contábamos sólo 8 trasplantados recibiendo tal asociación. Se trataba de pacientes trasplantados todos fuera, hacía menos de un año, y que les veíamos en consulta en seguimiento postrasplante (consultas compartidas con el centro trasplantador de origen). Verificar el impacto en la promoción de tolerancia estos nuevos esquemas terapéuticos llamados no nefrotóxicos es el objetivo de trabajos en curso.

El score se mostró desfavorable en 20 de los 35 trasplantados de buena evolución. Cincuenta y cinco por ciento (11/20) de los pacientes presentaban marcadores analíticos de inflamación, de los que ochenta por ciento (9 pacientes) recibían tacrólimus. Cuarenta por ciento (8/20) de los pacientes habían sufrido un SCA en el último año, reflejando la progresión de una aterosclerosis preexistente, de los que setenta y cinco por ciento (6 pacientes) recibían tacrólimus. Treinta por ciento (6/20) de los pacientes presentaban anemia, de los que ochenta por ciento (5 pacientes) recibían tacrólimus. Treinta por ciento (6/20) de los pacientes presentaban proteinuria, de los que un tercio (2 pacientes) recibían tacrólimus, un tercio (2 pacientes) recibían rapamicina y un tercio (2 pacientes) recibían everólimus. Finalmente, uno de los veinte trasplantados presentaba un hiperparatiroidismo secundario y seguía una inmunosupresión con tacrólimus.

Tuvimos un caso de rechazo agudo, el paciente recibía ciclosporina, trasplantado hacía 19 años, creatinina basal de 1.5mg/dL. Tregs de 10.78%. Diez puntos en el score por presentar marcadores de inflamación en la analítica (VSG y PCR elevadas) y por

seguir una inmunosupresión con anticalcineurínicos. Tres semanas más tarde, el paciente presentaba un deterioro agudo de la función del injerto, a pesar de la intensificación de la corticoterapia emprendida, sin necesidad de hemodiálisis. La biopsia revelaba un rechazo agudo celular que respondió a los esteroides a fuertes dosis (6 bolos de 250mg de 6-metil-prednisolona diarios).

Tuvimos un caso de rechazo crónico, el paciente recibía everólimus, trasplantado hacía 4 años, función renal normal. Tregs de 7.30%. Once puntos en el score por presentar descenso en el aclaramiento de creatinina (35% por MDRD-4), sumado a una proteinuria de 0.7gr/día, y por presentar marcadores de inflamación en la analítica (hipergammaglobulinemia policlonal). Dos meses después, a pesar de los cambios en el tratamiento que se juzgó pertinentes, ingresó porque la creatinina había aumentado de 1.7mg/dL a 3.2mg/dL, la proteinuria alcanzaba los 4gr/día y persistía todavía la hipergammaglobulinemia policlonal observada al inicio. La biopsia reveló una glomerulopatía del trasplante con un escaso componente de lesiones agudas.

El score se mostró desfavorable en 3 de los 11 trasplantados con cánceres e infecciones, pero estos pacientes no desarrollaron rechazo, a pesar de la disminución de la dosis del ImTOR en uno de ellos.

Hemos observado que la sola cuantificación de Tregs no fue suficiente para la implementación de un inmunocontrol del trasplantado renal porque altos porcentajes de Tregs podían traducirse en puntuaciones desfavorables en el Score de Tolerancia Inmunológica Clínica. El conteo de las células reguladoras circulantes no es suficiente criterio para anticipar una propensión al rechazo del alo-injerto.

Hemos mostrado que existe una preponderancia de los scores desfavorables en la cohorte de los 35 pacientes trasplantados renales de evolución favorable descrita, la mayor parte con anticalcineurínicos. Todas las correlaciones clínicas consideradas anti-tolerancia y que contribuyen a una puntuación desfavorable en el Score de Tolerancia Inmunológica Clínica merecen un trato distinto porque predisponen al rechazo, principalmente los marcadores de inflamación en la analítica y la progresión de una aterosclerosis preexistente.

Los datos testigo de una pérdida gradual de la función del injerto incluidos la anemia y el hiperparatiroidismo secundario deben ser considerados también como factores predisponentes al rechazo.

El rechazo es una de las limitaciones mayores en trasplante por lo que todos los esfuerzos para prevenirlo se encuentran justificados. El desarrollo de scores pronósticos debería permitir ajustes de la inmunosupresión con el fin de predecir y prevenir el rechazo, aunque también para limitar la toxicidad de las drogas inmunosupresoras. No obstante, la eficacia de estas modificaciones terapéuticas se encuentra subordinada a la validación de estos scores en cohortes importantes de pacientes. En los dos casos de rechazo que describimos, los ajustes en la inmunosupresión guiados por el Score de Tolerancia Inmunológica Clínica fueron insuficientes, por lo que éstos deberían reexaminarse teniendo en cuenta otros parámetros.

Hemos demostrado que es posible mediante la implementación del inmunocontrol identificar los trasplantados renales teniendo una predisposición a desarrollar un rechazo del alo-injerto.

## **6.3.2 Prevención de los cánceres e infecciones del postrasplante**

El trasplante de órganos constituye de momento la única posibilidad terapéutica para la mayoría de patologías que conducen a una pérdida irreversible de la función de órganos vitales como el riñón, corazón, hígado o pulmón, y en la mejor opción de tratamiento concerniendo a la Enfermedad Renal Crónica avanzada.

En los últimos 30 años, enormes progresos se han alcanzado en el campo de los tratamientos inmunosupresores que tienen por objeto prevenir o tratar el rechazo del aloinjerto. Los inmunosupresores de ahora deprimen de manera global la inmunidad y están desprovistos de toda especificidad frente a los alo-antígenos. Por ello, estos medicamentos no son lo totalmente eficaces (eficacia sobre el rechazo agudo pero no sobre el rechazo crónico) y además engendran un súper-inmunosupresión, causa de una frecuencia elevada de tumores e infecciones.

Uno de los objetivos de la investigación es poder inducir un estado de "tolerancia inmunitaria operacional" es decir, la ausencia de respuesta inmunitaria patógena frente a los alo-antígenos, sin afectar la capacidad del receptor para reaccionar de manera eficaz contra diversos antígenos exógenos.

En 2011, cerca de 505000 europeos vivían con un órgano trasplantado y miles se encontraban en la espera de un injerto. El aumento de las enfermedades crónicas y el envejecimiento de la población se traducen en un incremento de las indicaciones de

trasplante y en consecuencia de necesidades en términos de injertos. Simultáneamente, la baja importante de la mortalidad accidental y de la mortalidad por accidente vascular cerebral conducen a una disminución del número total de donantes potenciales. Aunque la cantidad de extracciones se encuentre actualmente en aumento por el hecho de haberse ampliado los criterios de selección de órganos a partir de donantes vivos (esencialmente para el riñón pero también para el hígado) o fallecidos en parada cardíaca, es innegable que la situación de penuria instalada durará.

En España, líder mundial en trasplante, el aumento en el número de implantes se debe sobre todo al aumento de donantes muertos en parada cardíaca y de donantes vivos, el número de donantes en estado muerte encefálica permaneciendo estable. Extraer los órganos de pacientes después de una parada cardíaca controlada plantea sin embargo problemas de índole ético y técnico. En lo que respecta a lo ético, uno de los riesgos mayores sería que dichas extracciones serían vividas como "eutanasias utilitarias".

¿Cómo aumentar la cantidad de órganos trasplantables? Ciertamente, existe una penuria crónica en este campo. Consecuencia, las listas de espera se alargan sensiblemente, principalmente para los trasplantes de riñón y de hígado. Hoy en día, probablemente la primera causa de fracaso del trasplante sea la falta de injertos. En 2012, más de 59200 personas en Europa necesitaron trasplantarse y 3744 pacientes fallecieron en espera de un injerto.

A pesar del avance en el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares del rechazo, la prevención del mismo depende de moléculas de inmunosupresores potencialmente tóxicas. Se busca la constitución de registros detallados de cánceres e

infecciones que permitan llegar a ajustes terapéuticos pertinentes (combinación de inmunosupresores, nuevas clases terapéuticas), sobre todo en el momento actual que revela una evolución hacia la práctica de trasplantes con personas cada vez más añosas, recurriendo a injertos de personas igualmente añosas.

Las complicaciones infecciosas constituyen un problema mayor a corto y mediano plazo. Consecuencia del tratamiento inmunosupresor no específico administrado crónicamente, constituyen la segunda causa de mortalidad tras las complicaciones cardiovasculares. Son frecuentes en los primeros seis meses postrasplante, periodo de fuerte inmunosupresión. El tratamiento profiláctico y la mejora de la antibioterapia han permitido no obstante una disminución de su incidencia y severidad. Todos los tipos de infecciones pueden darse en el paciente trasplantado aunque algunas son más específicas que otras (CMV, EBV, virus BK o JC, Tuberculosis, pielonefritis agudas del injerto, etc). Éstas pueden agravarse bajo el tratamiento con inhibidores de mTOR, pero una respuesta tolerógena exagerada es también responsable de su progresión [165]. Una consecuencia inevitable de una infección es la ruptura de un estado de tolerancia dominante [228].

Prevenir y limitar los cánceres tendría un gran impacto sobre la calidad de vida de los pacientes trasplantados y sobre su supervivencia. Uno de los principales factores predisponentes al desarrollo de cánceres es la patología preexistente habiendo conducido al trasplante: cáncer renal en trasplante renal y carcinoma hepatocelular asociado a los virus de la hepatitis B y C en trasplante hepático.

La aparición de cánceres se encuentra igualmente influenciada por el tratamiento inmunosupresor. Algunos inmunosupresores son capaces, más que otros, de inducir

cáncer. Si consideramos que una respuesta tolerógena excesiva puede también contribuir al desarrollo de tumores, drogas concebidas como antitumorales pero favoreciendo al mismo tiempo una respuesta tolerógena pueden acarrear un aumento de la incidencia y prevalencia de cánceres.

Los principales cánceres ligados al trasplante son viro-inducidos pero los más frecuentes son los cánceres cutáneos. Éstos son frecuentemente basocelulares o espinocelulares. Los otros tumores más frecuentemente encontrados después del trasplante son: linfomas postrasplante, asociados al virus EBV; sarcoma de Kaposi, ligado al virus HHV8; cánceres de la vulva, del ano y del cuello uterino, ligados a papilomavirus.

Para disminuir el riesgo de cáncer, los equipos de trasplante proponen diferentes estrategias de minimización de los tratamientos inmunosupresores y el recurso a drogas consideradas como antitumorales. Además de estas perspectivas farmacológicas, otras pistas pueden ser desarrolladas para mejorar la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes trasplantados: una mejor identificación de los factores de riesgo o de los factores predisponentes, un inmunocontrol clínico para evitar la sobredosificación de los inmunosupresores y que promueven tolerancia inmunitaria, la constitución de registros exhaustivos específicamente dedicados al cáncer incluyendo un despistaje pretrasplante y un seguimiento dirigido postrasplante, la educación de pacientes y la formación de los equipos de trasplante.

Estudiamos una cohorte de 11 trasplantados renales quienes, durante el último año, habían sido diagnosticados de cáncer o habían contraído una infección con necesidad de ingreso hospitalario. Estos pacientes debían necesariamente seguir un tratamiento con un inhibidor de mTOR para ser incluidos. Los tratamientos adyuvantes

como los corticoides, la azatioprina, el MMF o el micofenolato sódico no fueron considerados. La media de tiempo postrasplante fue de 5 años para los trasplantados con cáncer y 2 años para los trasplantados infectados. El cambio de tacrólimus por algún inhibidor de mTOR se llevó a cabo por un tumor en uno de estos 11 trasplantados y por nefrotoxicidad en el resto.

El STIC se mostró desfavorable en 3 de estos 11 trasplantados.

- Rbdomiosarcoma retroperitoneal, trasplantada hacía 3 años, función renal normal, carcinoma papilar de tiroides un año después del trasplante. Tregs de 28.59%. Diecisiete puntos en el score por presentar descenso en el aclaramiento de creatinina (55% por MDRD-4), además de una proteinuria de 1.3gr/día, y por presentar marcadores analíticos de inflamación (VSG de 100mm, hipergammaglobulinemia policlonal). Propuesta para una exéresis de los sarcomas asociada a quimioterapia y a una disminución de la dosis del ImTOR.
- Enfermedad por CMV, trasplantada hacía 6 meses, función renal normal, serología CMV positiva en el pretrasplante. En cuidados intensivos por fallo multiorgánico complicando su neumonitis y diarrea, necesitando de intubación y de hemodiafiltración veno-venosa continua. Tregs de 31.89%. Diecisiete puntos en el score por la pérdida aguda del aclaramiento (90% por MDRD-4), agregada a una proteinuria persistente de 1gr/día, y por presentar marcadores analíticos de inflamación (PCR muy elevada, hipergammaglobulinemia policlonal). Volvió a tacrólimus. Fallecida 72 horas después.
- Tuberculosis, trasplantado hacía 2 meses, sin función del injerto en el postrasplante inmediato con necesidad de hemodiálisis, que recuperó parcialmente hasta creatinina de 2.3-2.5mg/dL. Estancia hospitalaria muy complicada por una FA

desencadenando un empeoramiento de su insuficiencia cardiaca de base, acompañándose de nuevo deterioro de su función renal, necesitando otra vez de hemodiálisis. Tregs de 34.65%. Diecisiete puntos en el score por la pérdida del FG (85% por MDRD-4), por la proteinuria de 0.8gr/día y por los marcadores analíticos de inflamación (VSG de 100mm). Volvió a tacrólimus. Con mala tolerancia hemodinámica a la hemodiálisis, falleció tras parada cardio-respiratoria intra-diálisis.

Concerniente a los dos casos de pielonefritis, se trataba de trasplantados conocidos por sus infecciones urinarias anteriores. El score se mostró favorable puesto que presentaban marcadores de inflamación en la analítica (PCR elevada), proteinuria (0.5-0,6gr/día) pero ningún deterioro de la función del injerto. Estas pielonefritis respondieron lentamente al tratamiento antibiótico con ceftazidima 2gr/8 horas vía intravenosa, que tuvo que cambiarse a piperacilina/tazobactam 4gr/8 horas vía intravenosa una semana después, ante la persistencia de la fiebre a pesar de los cultivos negativos.

Los demás trasplantados con cánceres e infecciones, teniendo un STIC favorable, presentaron una evolución satisfactoria.

Hemos mostrado que en la cohorte de los 11 trasplantados con cánceres e infecciones descrita las puntuaciones fueron mayoritariamente favorables pero los scores desfavorables no se tradujeron en episodios de rechazo.

Hemos mostrado que porcentajes de Tregs elevados en trasplantados con cáncer e infectados pueden ser considerados como un argumento a favor de una exagerada respuesta tolerógena.

Altos porcentajes de Tregs con inhibidores de mTOR pueden traducirse en un peor curso de las infecciones, sobre todo si estas infecciones presentan factores de mal pronóstico.

Todas las drogas inmunosupresoras pueden provocar efectos adversos, que los cánceres sean secundarios a un tratamiento con inhibidores de mTOR debe confirmarse.

Es importante considerar en último término que la mala evolución de un tumor o de una infección puede tener consecuencias deletéreas para el establecimiento de una regulación de la respuesta inmune. ¿Cuales serían entonces los beneficios de una prevención eficaz de los cánceres y de las infecciones? El primero es nefrológico, pues estas dos situaciones por mecanismos no inmunológicos (hipoperfusión y caída de la presión arterial) pueden contribuir a un deterioro agudo de la función del injerto que no podría en el futuro ser recuperado totalmente, favoreciendo la aparición de la nefropatía del injerto. El segundo es inmunológico, pues por lo menos las infecciones pueden fracturar un estado de tolerancia dominante y desencadenar el rechazo. Un inmunocontrol clínico permitirá modificaciones de las posologías de los inmunosupresores para evitar la aparición de estas dos complicaciones mayores. Nuevamente, la validación de los scores pronósticos en cohortes significativas de pacientes es indispensable, al igual que la creación de registros de cánceres y de infecciones en los objetivos de armonizar el tratamiento de estos pacientes. De momento, una asociación entre los cánceres, las infecciones y la tolerancia inmunológica puede aceptarse.

# 7. Conclusiones



# 7. Conclusiones

1a

Hemos demostrado que fue posible el análisis de la población Treg mediante citometría de flujo y triple marcaje de membrana para el seguimiento de las subpoblaciones linfocitarias reguladoras circulantes de los trasplantados renales.

2a

Los umbrales de normalidad de Tregs (nTregs e iTregs) quedan establecidos de 7% a 35%, éstos probablemente sean los mismos en la población general no trasplantada.

3a

Existen diferencias entre los inhibidores de la calcineurina y los inhibidores de mTOR respecto a la frecuencia de células T reguladoras, siendo ésta más elevada con inhibidores de mTOR, lo que no significa necesariamente inmunotolerancia.

4a

El conteo de las células reguladoras circulantes no es suficiente criterio para anticipar una propensión al rechazo del alo-injerto.

5a

Todas las correlaciones clínicas consideradas anti-tolerancia y que contribuyen a una puntuación desfavorable en el Score de Tolerancia Inmunológica Clínica merecen un trato distinto porque predisponen al rechazo, principalmente los marcadores de inflamación en la analítica y la progresión de una aterosclerosis preexistente.

6a

Los datos testigo de una pérdida gradual de la función del injerto incluidos la anemia y el hiperparatiroidismo secundario deben ser considerados también como factores predisponentes al rechazo.

7a

En los dos casos de rechazo que describimos, los ajustes en la inmunosupresión guiados por el Score de Tolerancia Inmunológica Clínica fueron insuficientes, por lo que éstos deberían reexaminarse teniendo en cuenta otros parámetros.

8a

Hemos demostrado que es posible mediante la implementación del inmunocontrol identificar los trasplantados renales teniendo una predisposición a desarrollar un rechazo del alo-injerto.

9a

Hemos mostrado que en la cohorte de los 11 trasplantados con cánceres e infecciones descrita las puntuaciones fueron mayoritariamente favorables pero los scores desfavorables no se tradujeron en episodios de rechazo.

10a

Porcentajes de Tregs elevados en trasplantados con cáncer e infectados pueden ser considerados como un argumento a favor de una exagerada respuesta tolerógena.

11a

Altos porcentajes de Tregs con inhibidores de mTOR pueden traducirse en un peor curso de las infecciones, sobre todo si estas infecciones presentan factores de mal pronóstico.

12a

Una asociación entre los cánceres, las infecciones y la tolerancia inmunológica puede aceptarse.



# 8. Anexos



# 8. Anexos

## Anexo 1: Score de Tolerancia Inmunológica Clínica



## Score de Tolerancia Inmunológica Clínica (STIC)

| <b>Puntuación</b> | <b>Categoría</b>               |
|-------------------|--------------------------------|
| -1                | Anticalcineurínicos            |
| +6                | Inmunosupresión no nefrotóxica |
| +6                | Cánceres o infecciones         |
| +12               | Porcentaje de Treg "favorable" |
| -1                | Inflamación en la analítica    |
| -3                | Baja del FG                    |
| -3                | Microalbuminuria               |
| -1                | Antecedentes de rechazo        |

Puntuación favorable: a partir de 18 puntos



**Anexo 2: consentimiento informado**



# ESTUDIO INMUNOTOLERANCIA

## Formulario de consentimiento informado

Yo, (nombres y apellidos): \_\_\_\_\_

He sido propuesto a participar del estudio "**Tolerancia inmunológica en trasplante renal**". He podido hacer todas las preguntas que me han surgido sobre el mismo y recibido la información suficiente.

La información la he recibido del Dr(a): \_\_\_\_\_

Comprendo que mi participación es voluntaria y puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Entiendo que al acceder a participar de este estudio, consiento la recogida, tratamiento, cesión y transferencia (si procede) de los datos relacionados con el estudio, con respeto del anonimato.

Entiendo también que es necesaria la toma de una muestra sanguínea para la determinación objetivo.

Presto libremente mi conformidad a participar en el estudio.

Firma del paciente o representante legal:

\_\_\_\_\_

Firma del investigador principal (Dr Francisco Herrera):

\_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Tal y como se establece en la LOPD 15/1999 y Real Decreto 1720/2007, el consentimiento para el tratamiento de sus datos personales es revocable. Usted puede ejercer el derecho de acceso, rectificación y cancelación dirigiéndose al investigador.



**Anexo 3: Sistema BD FACSCalibur™**





# BD FACSCalibur Flow Cytometry System

## Technical Specifications

---

The BD FACSCalibur™ system is an automated benchtop flow cytometry system that offers three or four-color capability and can perform both cellular analysis and optional cell sorting.\* Designed specifically to support a wide range of applications, the BD FACSCalibur system offers easy to use software, multi-sample loading options, and intuitive instrument and fluidics control, to improve laboratory productivity. The BD FACSCalibur system is fully modular so it can be upgraded to meet future needs. For more information about the BD FACSCalibur system and other flow cytometry products from BD Biosciences, visit [bdbiosciences.com](http://bdbiosciences.com).

## Performance

---

### Fluorescence Sensitivity

Estimated detection limit: 750 molecules of equivalent soluble fluorescein.

### Fluorescence resolution

Coefficient of variation in FL2-Area of <3%, full peak for propidium iodide-stained chicken erythrocyte nuclei.

### Forward and side scatter sensitivity

Separation of fixed platelets from noise.

### Forward and side scatter resolution

Optimized scatter performance for resolving lymphocytes, monocytes, and granulocytes.

## Excitation Optics

---

### Optical platform

Fixed optical assembly

### Lasers

Air-cooled argon-ion laser, 15 milliwatt, 488 nm; life expectancy >5,000 hours. Optional second laser: nominally 635 nm.

### Beam geometry

Prismatic expander and achromatic spherical lens providing 22 x 66- $\mu$ m elliptical beam for argon-ion laser. Nominally 15 x 61- $\mu$ m elliptical beam for red-diode laser.

## Emission Optics

---

### Optical coupling

Quartz cuvette coupled to emission lens by refractive index matching optical gel for optimum collection efficiency.

### Background rejection

Obscuration blade and slit for minimizing unwanted laser radiation at the detector.

### Forward scatter detector and filter

High-performance solid state silicon detector with 488-nm bandpass filter for clear signal detection and red-diode (635-nm) laser signal rejection.

### Side scatter detector

High-performance photomultiplier using Brewster-angle beam splitter in the emission optical train.

### Fluorescence detectors and filters

Up to four high-performance, high dynamic range photomultipliers with bandpass filters: 530 nm (FITC), 585 nm (PE/PI), and >670 nm (PerCP) with base unit, and optional 661 nm (APC) with FL4 option.

## Fluidics

---

### General operation

Front key panel control in three modes: RUN, STANDBY, and PRIME; automatic standby mode for conserving sheath fluid by stopping sheath flow when no sample tube is installed.

### Fluid reservoirs

Easily accessible 4-L capacity sheath and waste containers housed in a convenient pull-out drawer; level detectors for automatic indicating of low levels of sheath or high levels of waste.

### Sample flow rates

Three selectable flow rates of 60  $\mu$ L/min, 35  $\mu$ L/min, and 12  $\mu$ L/min; regulated and monitored pressure difference between sheath and sample; particle velocity in flow cell: approximately 6 meters/second.

### Quartz cuvette

Internal cross-section: rectangular 430 x 180  $\mu$ m; antireflection coated external surfaces for maximum transmission of laser light.

### Sample concentration

Single-cell suspension of  $10^5$  to  $2 \times 10^7$  particles/mL recommended range.

## Signal Processing

### Workstation resolution

1,024 channels on all parameters.

### Dynamic range

Logarithmic amplifiers for SSC, FL1, FL2, FL3, and FL4 (with FL4 option), providing four log decade range.

### Fluorescence compensation networks

Compensation for fluorescence spectral overlap between FL1 and FL2, between FL2 and FL3, and between FL3 and FL4 channels (with FL4 option).

### Pulse processing

Width and area measurements for discriminating doublets; available for all fluorescence parameters.

### Time

Time available correlated to any parameter for kinetic experiments or other applications.

## Sample Loading Specifications

### Sample delivery

Tube-lifter design with multiple sensors that verify rack identification and tube position with optional BD FACSTM Loader.

### Rack capacity

40 (12 x 75-mm) tubes per rack.

### Rack support

Up to 16 racks per BD FACS Loader.

### Data entry

Sample information, reagent panels, and rack information can be defined for up to 640 tubes (40 tubes x 16 racks) at a time.

### Loader manager

Automated control through BD™ Worklist Manager software.

### Barcode scanner (optional)

Automates data entry for Codabar, Code 39, Interleaved 2 of 5, Code 2 of 5, and Code 128.

### Mixing mode

Adjustable high-energy and low-energy mix.

## Sorting Specifications\* (for sorting option)

### Sorting purity\*

>95%

### Capture rate\*

300 cells/second

### Sort modes\*

Three modes (all aerosol free): single cell, exclusion, and recovery.

### Recovery\*

Depending upon sample and sorting conditions, >50%.

### Sterile sorting\*

System design allows for aerosol-free sterile sorting.

## Data Management System

### Workstation

BD FACStation™ Mac Pro computer

### Processor

2.8-GHz Quad-Core Intel® Xeon® processor

### Memory

2 GB RAM

### Level 2 cache

4 MB per processor

### Data storage

320-GB 7200-rpm Serial ATA, 3Gb/s

### Networking

On-board Ethernet, built-in AppleTalk® Networking, and Apple® File Sharing

### Optical drive

16x SuperDrive

### Monitor

17-inch LCD monitor (optional)

### Data file structure

Flow Cytometry Standard (FCS) 2.0/3.0  
ASCII results file for data export

## Installation Requirements

### Power\*\*

US: 120 VAC ±10%, 50/60 Hz ±2 Hz,  
Current: 20 amp maximum outside  
US. External transformer needed for  
100 VAC ±10%, 50/60 Hz ±2 Hz, and  
220/240 VAC ±10%, 50/60 Hz ±2 Hz.

### Water supply

None required

### Air supply

None required

### Heat dissipation

BD FACScalibur system with all options  
6,500 BTU/h

## Operating Environment

### Temperature

16–29°C (60–85°F)

### Humidity

10% to 90% relative non-condensing

### Air filtering

No excessive dust and smoke

### Lighting

Optics and detectors shielded from room  
lighting

### Size

Sensor module  
(W x D x H): 91.4 x 61.5 x 67.3 cm  
(36 x 24.2 x 26.5 in);  
Height with cover option:  
124.5 cm (49 in)

### Computer

(W x D x H): 48 x 41 x 58 cm  
(19 x 16 x 23 in)

### Printer

(W x D x H): 48 x 41 x 58 cm  
(19 x 16 x 23 in)

### Weight

Sensor module: 109.1 kg (~240 lb);  
computer: varies with configuration

\*For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.  
\*\*BD recommends two dedicated circuits for instruments configured with any of the options.

Specifications subject to change without notice.

BD flow cytometers are Class I (1) laser products.

Unless otherwise noted, for In Vitro Diagnostic Use.

BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2009 BD

**23-3365-02**



**BD Biosciences**  
2350 Qume Drive  
San Jose, CA 95131  
US Orders: 877.232.8995  
answers@bd.com  
bdbiosciences.com

**Anexo 4: BD Pharmingen™ Human Regulatory T Cell Cocktail**



# BD Human Regulatory T Cell Cocktail (CD4/CD25/CD127)

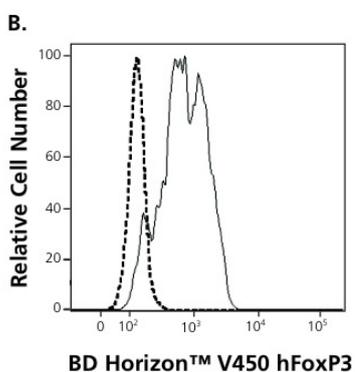
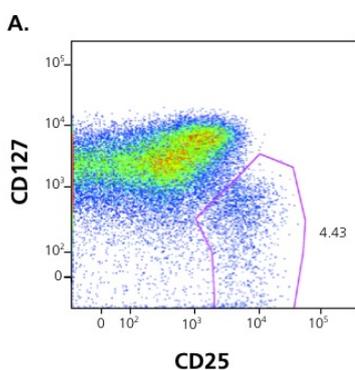
## Simplify identification and isolation of viable Tregs

### Features

Contains a three-color reagent in an easy-to-use, one-step preoptimized cocktail

Enhances enrichment of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> viable Treg populations

Can be used in combination with other reagents on most BD FACST<sup>™</sup> brand flow cytometers, including the BD FACSCalibur<sup>™</sup> system



**Three-color analysis of the expression of CD4, CD25, and CD127 on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).** PBMCs were stained with either an Isotype Control (Cat. Nos. 557872/555909; data not shown) or Human Regulatory T Cell Cocktail (Cat. No. 560249). The PBMCs were then fixed and permeabilized using the BD Pharmingen Human FoxP3 Buffer Set (Cat. No. 560098), and stained with BD Horizon<sup>™</sup> V450 conjugated anti-human FoxP3 monoclonal antibody (Cat. No. 560459).

During data analysis, lymphocytes were identified by light scatter profile and CD4 positive expression. **A)** Data representing the CD25 and CD127 expression profile of the CD4 positive cells. **B)** Data showing hFoxP3 expression on CD127<sup>low</sup>/CD25<sup>high</sup> Tregs (solid line) and other T cells (dashed line). Flow cytometry was performed on a BD<sup>™</sup> LSR II system.

The BD Pharmingen<sup>™</sup> Human Regulatory T Cell Cocktail is a three-color reagent that provides an optimized, reproducible method for the analysis and isolation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>int/high</sup>CD127<sup>low</sup> live natural regulatory T cell (Treg) populations. The reagent cocktail includes anti-human CD4 FITC (clone SK3), anti-human CD25 PE-Cy<sup>™</sup>7 (clone 2A3), and anti-human CD127 Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 (clone hIL-7R-M21). The one-step premixed cocktail simplifies Treg identification and significantly enhances enrichment of live Treg populations by 2 to 4 times compared to gating on CD25<sup>high</sup> alone.

### A flexible and effective surface marker combination

Tregs are a rare cell population representing 5–10% of all CD4<sup>+</sup> cells. The capture and analysis of these cells requires multiple markers. A common approach to the identification and isolation of Treg cells is the use of CD4<sup>+</sup> and CD25<sup>+</sup>. Only a subset of CD25<sup>+</sup>, mostly those with the highest levels of expression, are Tregs.

In the past, the lack of consensus regarding the definition of high and low levels of CD25 expression by Tregs has affected the ability to obtain consistent amounts of viable human Tregs via flow cytometric cell sorting. Ambiguity in this area led researchers to select only the cells expressing the highest level of CD25, resulting in reduction of total Treg recovery while using large quantities of samples and reagents.

FoxP3, a transcription factor, is considered to be a currently accepted marker of Tregs. However, detection of FoxP3 requires permeabilizing the cell membrane, preventing the use of these cells in downstream applications.

### Maximizing recovery of viable Tregs

In 2006, CD127 was identified as a suitable marker for Treg isolation. When used during flow cytometric sorting experiments, a gating strategy relying on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>int/high</sup>CD127<sup>low</sup> cells enriches the recovery of FoxP3 Tregs 2 to 4 times compared to gating on CD25<sup>high</sup> cells alone. A simple-to-use reagent, the BD Pharmingen brand Human Regulatory T Cell Cocktail streamlines discovery while maximizing the isolation and recovery of viable Tregs.

Visit [bdbiosciences.com/treg](http://bdbiosciences.com/treg) for more information.

# BD Human Regulatory T Cell Cocktail (CD4/CD25/CD127)

## References

1. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med.* 2006;203(7):1693-1700.
2. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> Treg cells. *J Exp Med.* 2006;203(7):1701-1711.

## Ordering Information

| Product description  | Clone                    | Isotype  | Format  | Quantity | Cat. No. |
|--|--------------------------|--|---|----------|----------|
| BD Pharmingen Human Regulatory T Cell Cocktail containing CD4<br>CD25<br>CD127 | SK3<br>2A3<br>hIL-7R-M21 | Mouse IgG <sub>1</sub> , κ<br>Mouse IgG <sub>1</sub> , κ<br>Mouse IgG <sub>1</sub> , κ | FITC<br>PE-Cy <sup>TM</sup> 7<br>Alexa Fluor® 647 | 50 Tests | 560249   |

**Note:** As with any tandems, there is a risk of degradation of the PE-Cy7 fluorophore. Users are advised against using PE to detect dim/weakly expressed antigens as there is a risk of signal spillover.

## Related Human Reagents

| Product description                   | Clone                         | Isotype   | Format                           | Quantity  | Cat. No. |
|---------------------------------------|-------------------------------|---|----------------------------------|-----------|----------|
| CD39                                  | TÜ66                          | Mouse IgG <sub>2b</sub> , κ   | PE                               | 100 Tests | 555464   |
|                                       |                               |   | APC                              | 100 Tests | 560239   |
| CD45RA                                | HI100                         | Mouse IgG <sub>2b</sub> , κ   | FITC                             | 100 Tests | 555488   |
|                                       |                               |   | PE                               | 100 Tests | 555489   |
|                                       |                               |   | APC                              | 100 Tests | 550855   |
|                                       |                               |   | PE-Cy <sup>TM</sup> 5            | 100 Tests | 555490   |
| CD73                                  | AD2                           | Mouse IgG <sub>1</sub> , κ  | Purified                         | 0.1 mg    | 550256   |
|                                       |                               |   | PE                               | 100 Tests | 550257   |
| CD127                                 | hIL-7R-M21                    | Mouse IgG <sub>1</sub> , κ  | Biotin                           | 100 Tests | 558633   |
|                                       |                               |   | Alexa Fluor® 647                 | 100 Tests | 558598   |
|                                       |                               |   | PE                               | 100 Tests | 557938   |
| HLA-DR                                | L243 (G46-6)                  | Mouse IgG <sub>2a</sub> , κ   | FITC                             | 100 Tests | 555811   |
|                                       |                               |   | PE                               | 100 Tests | 555812   |
|                                       |                               |   | PE-Cy <sup>TM</sup> 5            | 100 Tests | 555813   |
|                                       |                               |   | PE-Cy <sup>TM</sup> 7            | 100 Tests | 335795   |
|                                       |                               |   | APC-Cy <sup>TM</sup> 7           | 100 Tests | 335796   |
|                                       |                               |   | PerCP-Cy <sup>TM</sup> 5.5       | 50 Tests  | 339194   |
| FoxP3                                 | 259D/C7                       | Mouse IgG <sub>1</sub>  | PE                               | 100 Tests | 560046   |
|                                       |                               |   | Alexa Fluor® 488                 | 100 Tests | 560047   |
|                                       |                               |   | Alexa Fluor® 647                 | 100 Tests | 560045   |
|                                       |                               |   | BD Horizon <sup>TM</sup> V450    | 120 Tests | 560459   |
| FoxP3 Staining Kit - Alexa Fluor® 488 | 259D/C7,<br>RPA-T4,<br>M-A251 | Mouse IgG <sub>1</sub> ,<br>Mouse IgG <sub>1</sub> , κ,<br>Mouse IgG <sub>1</sub> , κ | Alexa Fluor® 488,<br>APC,<br>PE  | 100 tests | 560131   |
| FoxP3 Staining Kit - Alexa Fluor® 647 | M-A251,<br>259D/C7,<br>RPA-T4 | Mouse IgG <sub>1</sub> , κ,<br>Mouse IgG <sub>1</sub> ,<br>Mouse IgG <sub>1</sub> , κ | PE,<br>Alexa Fluor® 647,<br>FITC | 100 tests | 560132   |
| FoxP3 Staining Kit - PE               | 259D/C7,<br>RPA-T4,<br>M-A251 | Mouse IgG <sub>1</sub> ,<br>Mouse IgG <sub>1</sub> , κ,<br>Mouse IgG <sub>1</sub> , κ | PE,<br>FITC,<br>APC              | 100 tests | 560133   |
| Human FoxP3 Buffer Set                |                               |   |                                  | 100 Tests | 560098   |

For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.  
Class I (1) laser product.

Alexa Fluor® is a registered trademark of Molecular Probes.

Cy<sup>TM</sup> is a trademark of Amersham Biosciences Corp. Cy<sup>TM</sup> dyes are subject to proprietary rights of Amersham Biosciences Corp. and Carnegie Mellon University and are made and sold under license from Amersham Biosciences Corp. only for research and in vitro diagnostic use. Any other use requires a commercial sublicense from Amersham Biosciences Corp., 800 Centennial Avenue, Piscataway, NJ 08855-1327, USA.

BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2009 BD 23-10196-00



**BD Biosciences**  
2350 Qume Drive  
San Jose, CA 95131  
US Orders: 877.232.8995  
bdbiosciences.com

# 9. Bibliografía



# 9. Bibliografía

- [1] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of selftolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 1995; 155: 1151-1164.
- [2] Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M et al. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med*, 2001; 193: 1285-1294.
- [3] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 2003; 299: 1057-1061.
- [4] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 2003; 4: 330-336.
- [5] Khattri R, Cox T, Yasayko SA et al. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol*, 2003; 4: 337-342.
- [6] Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM et al. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity*, 2005; 22: 329-341.
- [7] Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci*, 2005; 102: 5138-5143.
- [8] Annacker O, Coombes JL, Malmstrom V et al. Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *J Exp Med*, 2005; 202: 1051-1061.

- [9] Annacker O, Burlen-Defranoux O, Pimenta-Araujo R et al. Regulatory CD4 T cells control the size of the peripheral activated/memory CD4 T cell compartment. *J Immunol*, 2000; 164: 3573-3580.
- [10] Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O et al. CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL- 10. *J Immunol*, 2001; 166: 3008-3018.
- [11] Murakami M, Sakamoto A, Bender J et al. CD25+CD4+ T cells contribute to the control of memory CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci*, 2002; 99: 8832-8837.
- [12] Bystry RS, Aluvihare V, Welch KA et al. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat Immunol*, 2001; 2: 1126-1132.
- [13] Lin CY, Graca L, Cobbold SP et al. Dominant transplantation tolerance impairs CD8+ T cell function but not expansion. *Nat Immunol*, 2002; 3: 1208-1213.
- [14] Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol*, 2004; 5: 266-271.
- [15] Nomura T, Sakaguchi S. Naturally arising CD25+CD4+ regulatory T cells in tumor immunity. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005; 293: 287-302.
- [16] Stock P, Akbari O, Berry G et al. Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity. *Nat Immunol*, 2004; 5: 1149-1156.
- [17] Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol*, 2005; 6: 353-360.
- [18] Watanabe N, Wang YH, Lee HK et al. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature*, 2005; 436: 1181-1185.
- [19] Tai X, Cowan M, Feigenbaum L et al. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol*, 2005; 6: 152-162.

- [20] Schmidt-Supprian M, Tian J, Grant EP et al. Differential dependence of CD4+CD25+ regulatory and natural killer-like T cells on signals leading to NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci*, 2004; 101: 4566-4571.
- [21] Setoguchi R, Hori S, Takahashi T et al. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med*, 2005; 201: 723-735.
- [22] Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA et al. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol*, 2005; 6: 1142-1151.
- [23] Gavin MA, Clarke SR, Negrou E et al. Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol*, 2002; 3: 33-41.
- [24] Lohr J, Knoechel B, Jiang S et al. The inhibitory function of B7 costimulators in T cell responses to foreign and self-antigens. *Nat Immunol*, 2003; 4: 664-669.
- [25] Muller YD, Seebach JD, Bühler LH et al. Transplantation tolerance: Clinical potential of regulatory T cells. *Self/nonself*, 2011; 2: 26-34.
- [26] Bilate AM, Lafaille JJ. Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. *Annu Rev Immunol*, 2012; 30: 733-758.
- [27] Zheng SG, Wang J, Wang P et al. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *J Immunol*, 2007; 178: 2018-2027.
- [28] Vu MD, Xiao X, Gao W et al. OX40 costimulation turns off Foxp3+ Tregs. *Blood*, 2007; 110: 2501-2510.
- [29] Mariat C, Degauque N, Strom TB. TIM-1: a new player in transplant immunity. *Transplantation*, 2009; 87: 84-86.
- [30] Zeiser R, Negrin RS. Interleukin-2 receptor down-stream events in regulatory T cells: implications for the choice of immunosuppressive drug therapy. *Cell Cycle*, 2008; 7: 458-462.

- [31] Baron U, Floees S, Wieczorek G et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol*, 2007; 37: 2378-2389.
- [32] Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A et al. Role of conserved non-coding DNA elements in the *Foxp3* gene in regulatory T-cell fate. *Nature*, 2010; 463: 808-812.
- [33] Lu LF, Thai TH, Calado DP et al. *Foxp3*-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. *Immunity*, 2009; 30: 80-91.
- [34] Maganto-Garcia E, Bu D-X, Tarrío ML et al. *Foxp3*<sup>+</sup>-inducible regulatory T cells suppress endothelial activation and leukocyte recruitment. *J Immunol* 2011; 187: 3521-3529.
- [35] Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T (H) 17 lineage. *Nature*, 2006; 441: 231-234.
- [36] Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ et al. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 2006; 24: 179-189.
- [37] Bettelli E, Carrier Y, Gao W et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 2006; 441: 235-238.
- [38] Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4<sup>+</sup>FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood*, 2007; 110: 2983-2990.
- [39] Ochando JC, Yopp AC, Yang Y et al. Lymph node occupancy is required for the peripheral development of alloantigen-specific *Foxp3*<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol*, 2005; 174: 6993-7005.

- [40] Iellem A, Mariani M, Lang R 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: 847-853.
- [41] Curiel TJ, Coukos G, Zou L et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*, 2004; 10: 942-949.
- [42] Lee I, Wang L, Wells AD et al. Recruitment of Foxp3+ T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor. *J Exp Med*, 2005; 201: 1037-1044.
- [43] Suffia I, Reckling SK, Salay G et al. A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of *Leishmania major* infection. *J Immunol*, 2005; 174: 5444-5455.
- [44] Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K et al. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med*, 2003; 198: 235-247.
- [45] Walker LS, Chodos A, Eggena M et al. Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo. *J Exp Med*, 2003; 198: 249-258.
- [46] Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S et al. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF- $\beta$  secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med*, 2005; 202: 919- 929.
- [47] Von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol*, 2005; 6: 338-344.
- [48] Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*, 1998; 188: 287-296.
- [49] Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*, 2003; 4: 1206-1212.

- [50] Paust S, Lu L, Mc Carty N et al. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci*, 2004; 101: 10398-10403.
- [51] Wildin RS, Ramsdell F, Peake J et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet*, 2001; 27: 18-20.
- [52] Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*, 2001; 27: 68-73.
- [53] Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet*, 2002; 39: 537-545.
- [54] Baud O, Goulet O, Canioni D et al. Treatment of the immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) by allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med*, 2001; 344: 1758-1762.
- [55] Kriegel MA, Lohmann T, Gabler C et al. Defective suppressor function of human CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II. *J Exp Med*, 2004; 199: 1285-1291.
- [56] Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med*, 2004; 200: 277-285.
- [57] Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL et al. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med*, 2004; 199: 971-979.
- [58] Baladina A, Lecart S, Darteville P, et al. Functional defect of regulatory CD4(+)/CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. *Blood*, 2005; 105: 735-741.

- [59] Karlsson MR, Rugtveit J, Brandtzaeg P. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J Exp Med*, 2004; 199: 1679-1688.
- [60] Maul J, Loddenkemper C, Mundt P et al. Peripheral and intestinal regulatory CD4+CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2005; 128: 1868-1878.
- [61] Kinter AL, Hennessey M, Bell A et al. CD25(+)CD4(+) regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4(+) and CD8(+) HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status. *J Exp Med*, 2004; 200: 331-343.
- [62] Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S et al. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*, 2002; 420: 502-507.
- [63] Walther M, Tongren JE, Andrews L et al. Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity*, 2005; 23: 287-296.
- [64] Ko K, Yamazaki S, Nakamura K et al. Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *J Exp Med*, 2005; 202: 885-891.
- [65] Phan GQ, Yang JC, Sherry RM et al. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci*, 2003; 100: 8372-8377.
- [66] Habib R, Beziau A, Goulet O et al. Renal involvement in autoimmune enteropathies. *Ann Pediatr (Paris)*, 1993; 40: 103-107.
- [67] Ruemmele FM, Brousse N, Goulet O. Autoimmune enteropathy: molecular concepts. *Curr Opin Gastroenterol*, 2004; 20: 587-591.
- [68] Kobayashi I, Imamura K, Kubota M et al. Identification of an autoimmune enteropathy-related 75-kilodalton antigen. *Gastroenterology*, 1999; 117: 823-830.

- [69] Zuber J, Viguier M, Lemaître F et al. A new polyautoimmune syndrome associating regulatory T cell deficiency and pan-hypogammaglobulinemia. European Society for Immunodeficiencies 2004, Paris.
- [70] Boyer O, Saadoun D, Abriol J et al. CD4+CD25+ regulatory T-cell deficiency in patients with hepatitis C-mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Blood*, 2004; 103: 3428-3430.
- [71] Marinaki S, Neumann I, Kalsch AI et al. Abnormalities of CD4 T cell subpopulations in ANCA associated vasculitis. *Clin Exp Immunol*, 2005; 140: 181-191.
- [72] Salama AD, Chaudhry AN, Holthaus KA et al. Regulation by CD25+ lymphocytes of autoantigen-specific T-cell responses in Goodpasture's (anti-GBM) disease. *Kidney Int*, 2003; 64: 1685-1694.
- [73] Wolf D, Hochegger K, Wolf AM et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in mice. *J Am Soc Nephrol*, 2005; 16: 1360-1370.
- [74] Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol*, 2003; 3: 199-210.
- [75] Bour-Jordan H, Salomon BL, Thompson HL et al. Costimulation controls diabetes by altering the balance of pathogenic and regulatory T cells. *J Clin Invest*, 2004; 114: 979-987.
- [76] Edinger M, Hoffmann P, Ermann J et al. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med*, 2003; 9: 1144-1150.
- [77] Bushell A, Jones E, Gallimore A et al. The generation of CD25+ CD4+ regulatory T cells that prevent allograft rejection does not compromise immunity to a viral pathogen. *J Immunol*, 2005; 174: 3290-3297.
- [78] Qin S, Cobbold SP, Pope H et al. « Infectious » transplantation tolerance. *Science*, 1993; 259: 974-977.

- [79] Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H et al. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med*, 2002; 196: 255-260.
- [80] Graca L, Cobbold SP, Waldmann H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J Exp Med*, 2002; 195: 1641-1646.
- [81] Cobbold SP, Castejon R, Adams E et al. Induction of Foxp3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J Immunol*, 2004; 172: 6003-6010.
- [82] Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science*, 2003; 299: 1033-1036.
- [83] Pasare C, Medzhitov R. Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. *Immunity*, 2004; 21: 733-741.
- [84] Yang Y, Huang CT, Huang X et al. Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance. *Nat Immunol*, 2004; 5: 508-515.
- [85] Kotton CN, Fishman JA. Viral infection in the renal transplant recipient. *J Am Soc Nephrol*, 2005; 16: 1758-1774.
- [86] Peng G, Guo Z, Kiniwa Y et al. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science*, 2005; 309: 1380-1384.
- [87] Van Buskirk AM, Burlingham WJ, Jankowska-Gan E et al. Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J Clin Invest*, 2000; 106: 145-155.
- [88] Salama AD, Najafian N, Clarkson MR et al. Regulatory CD25+ T cells in human kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*, 2003; 14: 1643-1651.
- [89] Game DS, Hernandez-Fuentes MP, Chaudhry AN et al. CD4+CD25+ regulatory T cells do not significantly contribute to direct pathway hyporesponsiveness in stable renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol*, 2003; 14: 1652-1661.

- [90] Rodriguez DS, Jankowska-Gan E, Haynes LD et al. Immune regulation and graft survival in kidney transplant recipients are both enhanced by human leukocyte antigen matching. *Am J Transplant*, 2004; 4: 537-543.
- [91] Hancock W, Meyers K, Mc Donald R. Intra-graft FOXP3+ CD4 T cells and good graft function in pediatric renal transplant recipients receiving a calcineurin inhibitor avoidance protocol. *Am J Transplant*, 2005; 5: A545.
- [92] Muthukumar T, Dadhania D, Ding R et al. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renalallograft recipients. *N Engl J Med*, 2005; 353: 2342-2351.
- [93] Lakkis FG, Sayegh MH. Memory T cells: a hurdle to immunologic tolerance. *J Am Soc Nephrol*, 2003; 14: 2402-2410.
- [94] Heeger PS, Greenspan NS, Kuhlenschmidt S et al. Pretransplant frequency of donor-specific, IFN-gamma-producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of posttransplant rejection episodes. *J Immunol*, 1999; 163: 2267-2275.
- [95] Chen Y, Heeger PS, Valujskikh A. In vivo helper functions of alloreactive memory CD4+ T cells remain intact despite donor-specific transfusion and anti-CD40 ligand therapy. *J Immunol*, 2004; 172: 5456-5466.
- [96] Valujskikh A, Pantenburg B, Heeger PS. Primed allospecific T cells prevent the effects of costimulatory blockade on prolonged cardiac allograft survival in mice. *Am J Transplant*, 2002; 2: 501-509.
- [97] Pearl JP, Parris J, Hale DA et al. Immunocompetent T-cells with a memory-like phenotype are the dominant cell type following antibody-mediated T-cell depletion. *Am J Transplant*, 2005; 5: 465-474.
- [98] Krystufkova E, Sekerkova A, Striz I et al. Regulatory T cells in kidney transplant recipients: the effect of induction immunosuppression therapy. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 0: 1-7.

- [99] Wu Z, Bensinger SJ, Zhang J et al. Homeostatic proliferation is a barrier to transplantation tolerance. *Nat Med*, 2004; 10: 87-92.
- [100] Li Y, Li XC, Zheng XX et al. Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat Med*, 1999; 5: 1298-1302.
- [101] Coenen JJ, Koenen HJ, Rijssen EV et al. Rapamycin, and not Cyclosporin A, preserves the highly suppressive CD127-subset of human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Blood*, 2006; 107: 1018-1023.
- [102] Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo MG. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood*, 2005; 105: 4743-4748.
- [103] Abadja F, Alamartine E, Berthoux F et al. Quantification of circulating regulatory T cells by flow cytometry in kidney transplant patients after basiliximab induction therapy. *Transplantation*, 2010; 89: 366-368.
- [104] Hernandez-Fuentes MP, Warrens AN, Lechler RI. Immunologic monitoring. *Immunol Rev*, 2003; 196: 247-264.
- [105] Bonnefoix T, Bonnefoix P, Perron P et al. Quantitating effector and regulatory T lymphocytes in immune responses by limiting dilution analysis modeling. *J Immunol*, 2005; 174: 3421-3431.
- [106] Koenen HJ, Fasse E, Joosten I. CD27/CFSE-based ex vivo selection of highly suppressive alloantigen-specific human regulatory T cells. *J Immunol*, 2005; 174: 7573-7583.
- [107] Guillet M, Brouard S, Gagne K et al. Different qualitative and quantitative regulation of V beta TCR transcripts during early acute allograft rejection and tolerance induction. *J Immunol*, 2002; 168: 5088-5095.
- [108] Michalek J, Collins RH, Hill BJ et al. Identification and monitoring of graft-versus-host specific T-cell clone in stem cell transplantation. *Lancet*, 2003; 361: 1183-1185.

- [109] Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ Treg cells. *J Exp Med*, 2006; 203: 1701-1711.
- [110] Jiang H, Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest*, 2004; 114: 1198-1208.
- [111] Allison SJ. Treg cells predict risk of cutaneous squamous cell cancer after transplantation. *Nat Rev Nephrol*, 2010 ; 6 : 249.
- [112] Clark RA, Huang SJ, Murphy GF et al. Human squamous cell carcinomas evade the immune response by down-regulation of vascular E-selectin and recruitment of regulatory T cells. *J Exp Med*, 2008; 205: 2221-2234.
- [113] Carroll RP, Segundo DS, Hollowood K et al. Immune phenotype predicts risk for posttransplantation squamous cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol*, 2010; 21: 713-722.
- [114] Herrera F, Nocito M, Martin D et al. Are cancer and infections the clinical correlations of transplant tolerance? Scientific reunion of the Castellano-Astur-Leonesa Society of Nephrology (SCALN) 2013, Valladolid.
- [115] Zheng XX, Sanchez-Fueyo A, Sho M et al. Favorably tipping the balance between cytopathic and regulatory T cells to create transplantation tolerance. *Immunity*, 2003; 19: 503-514.
- [116] Zhang H, Chua KS, Guimond M et al. Lymphopenia and interleukin-2 therapy alter homeostasis of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Nat Med*, 2005; 11: 1238-1243.
- [117] Keymeulen B, Vandemeulebroucke E, Ziegler AG et al. Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med*, 2005; 352: 2598-2608.
- [118] Belghith M, Bluestone JA, Barriot S et al. TGF-beta-dependent mechanisms mediate restoration of self-tolerance induced by antibodies to CD3 in overt autoimmune diabetes. *Nat Med*, 2003; 9: 1202-1208.
- [119] Herold KC, Burton JB, Francois F et al. Activation of human T cells by FcR nonbinding anti-CD3 mAb, hOKT3gamma1(Ala-Ala). *J Clin Invest*, 2003; 111: 409-418.

- [120] Hering J, Kandaswamy R, Parkey J. Long-term insulin independence after single-donor islet transplantation in type I diabetes with hOKT3g-1 (Ala-Ala), sirolimus, and tacrolimus therapy. *Am J Transplant*, 2005; 5: A 275.
- [121] Dijke IE, Weimar W, Baan CC. Regulatory T cells after organ transplantation: where does their action take place? *Hum Immunol*, 2008; 69: 389-398.
- [122] Kollins D, Stoelcker B, Hoffmann U et al. FOXP3+ regulatory T-cells in renal allografts: correlation with long-term graft function and acute rejection. *Clin Nephrol*, 2011; 75: 91-100.
- [123] Veronese F, Rotman S, Smith RN et al. Pathological and clinical correlates of FOXP3+ cells in renal allografts during acute rejection. *Am J Transplant*, 2007; 7: 914-922.
- [124] Yapici U, Bemelman FJ, Scheepstra CG et al. Intragraft FOXP3 protein or mRNA during acute renal allograft rejection correlates with inflammation, fibrosis, and poor renal outcome. *Transplantation*, 2009; 87: 1377-1380.
- [125] Batsford S, Dickenmann M, Dürmüller U et al. Is monitoring of FOXP3 Treg cells in renal transplants during acute cellular rejection episodes useful? *Clin Nephrol*, 2011; 75: 101-106.
- [126] Bunnag S, Allanach K, Jhangri GS et al. FOXP3 expression in human kidney transplant biopsies is associated with rejection and time post transplant but not with favorable outcomes. *Am J Transplant*, 2008; 8: 1423-1433.
- [127] Taflin C, Nochy D, Hill G et al. Regulatory T cells in kidney allo-graft infiltrates correlate with initial inflammation and graft function. *Transplantation*, 2010; 89: 194-199.
- [128] Mansour H, Homs S, Desvaux D et al. Intragraft levels of Foxp3 mRNA predict progression in renal transplants with borderline change. *J Am Soc Nephrol*, 2008; 19: 2277-2281.

- [129] Grimbert P, Mansour H, Desvaux D et al. The regulatory/cytotoxic graft-infiltrating T cells differentiate renal allograft borderline change from acute rejection. *Transplantation*, 2007; 83: 341-346.
- [130] Bestard O, Cruzado JM, Rama I et al. Presence of FoxP3+ regulatory T cells predicts outcome of subclinical rejection of renal allo-grafts. *J Am Soc Nephrol*, 2008; 19: 2020-2026.
- [131] Bestard O, Cuñetti L, Cruzado JM et al. Intragraft regulatory T cells in protocol biopsies retain Foxp3 demethylation and are protective biomarkers for kidney graft outcome. *Am J Transplant*, 2011; 11: 2162-2172.
- [132] Louis S, Braudeau C, Giral M et al. Contrasting CD25highCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation*, 2006; 81: 398-407.
- [133] Akl A, Jones ND, Rogers N et al. An investigation to assess the potential of CD25highCD4+ T cells to regulate responses to donor alloantigens in clinically stable renal transplant recipients. *Transpl Int*, 2008; 21: 65-73.
- [134] Braudeau C, Racape M, Giral M et al. Variation in numbers of CD4+CD25highFOXP3+ T cells with normal immuno-regulatory properties in long-term graft outcome. *Transpl Int*, 2007; 20: 845-855.
- [135] Zuber J, Brodin-Sartorius A, Lapidus N et al. FOXP3-enriched infiltrates associated with better outcome in renal allografts with inflamed fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*, 2009; 24: 3847-3854.
- [136] Zuber J. Nephropathy and autoimmune enteropathies: role of CD4+CD25+FOXP3+ T cell regulatory functions. *Nephrol Ther*, 2008; 4: 43-44.
- [137] Thaunat O, Nicoletti A. Lymphoid neogenesis in chronic rejection. *Curr Opin Organ Transplant*, 2008; 13: 16-19.

- [138] Ashton-Chess J, Dugast E, Colvin RB et al. Regulatory, effector, and cytotoxic T cell profiles in long-term kidney transplant patients. *J Am Soc Nephrol*, 2009; 20: 1113-1122.
- [139] Deteix C, Attuil-Audenis V, Duthey A et al. Intragraft Th17 Infiltrate promotes lymphoid neogenesis and hastens clinical chronic rejection. *J Immunol*, 2010; 184: 5344-5351.
- [140] Bestard O, Cruzado JM, Mestre M et al. Achieving donor-specific hyporesponsiveness is associated with FOXP3+ regulatory T cell recruitment in human renal allograft infiltrates. *J Immunol*, 2007; 179: 4901-4909.
- [141] Demirkiran A, Baan CC, Kok A et al. Intrahepatic detection of FOXP3 gene expression after liver transplantation using minimally invasive aspiration biopsy. *Transplantation*, 2007; 83: 819-823.
- [142] Aquino-Dias EC, Joelsons G, Da Silva DM et al. Non-invasive diagnosis of acute rejection in kidney transplants with delayed graft function. *Kidney Int*, 2008; 73: 877-884.
- [143] Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*, 2009; 30: 899-911.
- [144] Tafllin C, Miyara M, Nochy D et al. FoxP3+ regulatory T cells suppress early stages of granuloma formation but have little impact on sarcoidosis lesions. *Am J Pathol*, 2009; 174: 497-508.
- [145] Zuber J, Viguier M, Lemaître F et al. Severe FOXP3+ and naïve T lymphopenia in a non-IPEX form of autoimmune enteropathy combined with an immunodeficiency. *Gastroenterology*, 2007; 132: 1694-1704.
- [146] Gavin MA, Torgerson TR, Houston E et al. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006; 103: 6659-6664.

- [147] Pillai V, Ortega SB, Wang CK et al. Transient regulatory T-cells: a state attained by all activated human T-cells. *Clin Immunol*, 2007; 123: 18-29.
- [148] Toker A, Huehn J. To be or not to be a Treg cell: lineage decisions controlled by epigenetic mechanisms. *Sci Signal*, 2011; 4: pe4.
- [149] Akimova T, Kamath BM, Goebel JW et al. Differing effects of rapamycin or calcineurin inhibitor on T-regulatory cells in pediatric liver and kidney transplant recipients. *Am J Transplant*, 2012; 12: 3449-3461.
- [150] Wieczorek G, Asemissen A, Model F et al. Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer Res*, 2009; 69: 599-608.
- [151] Yang X-P, Ghoreschi K, Steward-Tharp SM et al. Opposing regulation of the Il17 locus through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5. *Nat Immunol*, 2011; 12: 247-254.
- [152] Neujahr DC, Chen C, Huang X et al. Accelerated memory cell homeostasis during T cell depletion and approaches to overcome it. *J Immunol*, 2006; 176: 4632-4639.
- [153] Gurkan S, Luan Y, Dhillon N et al. Immune reconstitution following rabbit antithymocyte globulin. *Am J Transplant*, 2010; 10: 2132-2141.
- [154] Broady R, Yu J, Levings MK. ATG-induced expression of FOXP3 in human CD4+ T cells in vitro is associated with T-cell activation and not the induction of FOXP3+ T regulatory cells. *Blood*, 2009; 114: 5003-5006.
- [155] Vallotton L, Hadaya K, Venetz J-P et al. Monitoring of CD4+CD25highIL-7R+high activated T Cells in Kidney Transplant Recipients. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2011; 6: 2025-2033.
- [156] Flechner SM, Friend PJ, Brockmann J et al. Alemtuzumab induction and sirolimus plus mycophenolate mofetil maintenance for CNI and steroid-free kidney transplant immunosuppression. *Am J Transplant*, 2005; 5: 3009-3014.

- [157] Wu Y, Borde M, Heissmeyer V et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*, 2006; 126: 375-387.
- [158] Kang HG, Zhang D, Degauque N et al. Effects of cyclosporine on transplant tolerance: the role of IL-2. *Am J Transplant*, 2007; 7: 1907-1916.
- [159] Haasch D, Chen Y-W, Reilly RM et al. T cell activation induces a noncoding RNA transcript sensitive to inhibition by immunosuppressant drugs and encoded by the proto-oncogene, BIC. *Cell Immunol*, 2002; 217: 78-86.
- [160] Fourtounas C, Dousdampanis P, Sakellarakis P et al. Different immunosuppressive combinations on T-cell regulation in renal transplant recipients. *Am J Nephrol*, 2010; 32: 1-9.
- [161] Gao W, Lu Y, El Essawy B et al. Contrasting effects of cyclosporine and rapamycin in de novo generation of alloantigen-specific regulatory T cells. *Am J Transplant*, 2007; 7: 1722-1732.
- [162] Presser D, Sester U, Mohrbach J et al. Differential kinetics of effector and regulatory T cells in patients on calcineurin inhibitor-based drug regimens. *Kidney Int*, 2009; 76: 557-566.
- [163] Wang H, Zhao L, Sun Z et al. A potential side effect of cyclosporin A: inhibition of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in mice. *Transplantation*, 2006; 82: 1484-1492.
- [164] Haxhinasto S, Mathis D, Benoist C. The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4+Foxp3+ cells. *J Exp Med*, 2008; 205: 565-574.
- [165] Zuber J, Hermine O, Chatenoud L et al. Harnessing regulatory T cells for transplant tolerance in the clinic through mTOR inhibition: myth or reality? *Curr Opin Organ Transplant*, 2011; 16: 606-613.
- [166] Sauer S, Bruno L, Hertweck A et al. T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008; 105: 7797-7802.

- [167] Delgoffe GM, Kole TP, Zheng Y et al. The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. *Immunity*, 2009; 30: 832-844.
- [168] Patterson SJ, Han JM, Garcia R et al. Cutting edge : PHLPP regulates the development, function, and molecular signaling pathways of regulatory T cells. *J Immunol*, 2011; 186: 5533-5537.
- [169] Ouyang W, Li MO. Foxo : in command of T lymphocyte homeostasis and tolerance. *Trends Immunol*, 2011; 32: 26-33.
- [170] Bensinger SJ, Walsh PT, Zhang J et al. Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*, 2004; 172: 5287-5296.
- [171] Yu A, Zhu L, Altman NH et al. A low interleukin-2 receptor signaling threshold supports the development and homeostasis of T regulatory cells. *Immunity*, 2009; 30: 204-217.
- [172] Basu S, Golovina T, Mikheeva T et al. Cutting edge: Foxp3-mediated induction of pim 2 allows human T regulatory cells to preferentially expand in rapamycin. *J Immunol*, 2008; 180: 5794-5798.
- [173] Fox CJ, Hammerman PS, Thompson CB. The Pim kinases control rapamycin-resistant T cell survival and activation. *J Exp Med*, 2005; 201: 259-266.
- [174] Thomson AW, Turnquist HR, Raimondi G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol*, 2009; 9: 324-337.
- [175] Ruan Q, Kameswaran V, Tone Y et al. Development of Foxp3<sup>β</sup> regulatory T cells is driven by the c-Rel enhanceosome. *Immunity*, 2009; 31: 932-940.
- [176] Wan YY, Chi H, Xie M et al. The kinase TAK1 integrates antigen and cytokine receptor signaling for T cell development, survival and function. *Nat Immunol*, 2006; 7: 851-858.
- [177] Lio CW, Hsieh CS. A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity*, 2008; 28: 100-111.

- [178] Battaglia M, Stabilini A, Migliavacca B et al. Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Immunol*, 2006; 177: 8338-8347.
- [179] Game DS, Hernandez-Fuentes MP, Lechler RI. Everolimus and basiliximab permit suppression by human CD4+CD25+ cells in vitro. *Am J Transplant*, 2005; 5: 454-464.
- [180] Strauss L, Czystowska M, Szajnik M et al. Differential responses of human regulatory T cells (Treg) and effector T cells to rapamycin. *PLoS One*, 2009; 4: e5994.
- [181] Teachey DT, Obzut DA, Axsom K et al. Rapamycin improves lymphoproliferative disease in murine autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Blood*, 2006; 108: 1965-1971.
- [182] Teachey DT, Greiner R, Seif A et al. Treatment with sirolimus results in complete responses in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Br J Haematol*, 2009; 145: 101-106.
- [183] Brouard S, Puig-Pey I, Lozano JJ et al. Comparative transcriptional and phenotypic peripheral blood analysis of kidney recipients under cyclosporin A or sirolimus monotherapy. *Am J Transplant*, 2010; 10: 2604-2614.
- [184] Noris M, Casiraghi F, Todeschini M et al. Regulatory T cells and T cell depletion: role of immunosuppressive drugs. *J Am Soc Nephrol*, 2007; 18: 1007-1018.
- [185] Knechtle SJ, Pirsch JD, H Fechner J et al. Campath-1H induction plus rapamycin monotherapy for renal transplantation: results of a pilot study. *Am J Transplant*, 2003; 3: 722-730.
- [186] Knechtle SJ, Pascual J, Bloom DD et al. Early and limited use of tacrolimus to avoid rejection in an alemtuzumab and sirolimus regimen for kidney transplantation: clinical results and immune monitoring. *Am J Transplant*, 2009; 9: 1087-1098.

- [187] Ruggenenti P, Perico N, Gotti E et al. Sirolimus versus cyclosporine therapy increases circulating regulatory T cells, but does not protect renal transplant patients given alemtuzumab induction from chronic allograft injury. *Transplantation*, 2007; 84: 956-964.
- [188] Procaccini C, De Rosa V, Galgani M et al. An oscillatory switch in mTOR kinase activity sets regulatory T cell responsiveness. *Immunity*, 2010; 33: 929-941.
- [189] Park SG, Mathur R, Long M et al. T regulatory cells maintain intestinal homeostasis by suppressing gammadelta T cells. *Immunity*, 2010; 33: 791-803.
- [190] Patton DT, Wilson MD, Rowan WC et al. The PI3K p110delta regulates expression of CD38 on regulatory T cells. *PLoS One*, 2011; 6: e17359.
- [191] Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*, 2011; 11: 119-130.
- [192] Wander SA, Hennessy BT, Slingerland JM. Next-generation mTOR inhibitors in clinical oncology: how pathway complexity informs therapeutic strategy. *J Clin Invest*, 2011; 121: 1231-1241.
- [193] Powell JD, Delgoffe GM. The mammalian target of rapamycin: linking T cell differentiation, function, and metabolism. *Immunity*, 2010; 33: 301-311.
- [194] Hippen KL, Merkel SC, Schirm DK et al. Massive ex vivo expansion of human natural regulatory T cells (Tregs) with minimal loss of in vivo functional activity. *Sci Transl Med*, 2011; 3: 83ra41.
- [195] Ferrer IR, Araki K, Ford ML. Paradoxical aspects of rapamycin immunobiology in transplantation. *Am J Transplant*, 2011; 11: 654-659.
- [196] Saemann MD, Haidinger M, Hecking M et al. The multifunctional role of mTOR in innate immunity: implications for transplant immunity. *Am J Transplant*, 2009; 9: 2655-2661.

- [197] Ferrer IR, Wagener ME, Robertson JM et al. Cutting edge: rapamycin augments pathogen-specific but not graft-reactive CD8+ T cell responses. *J Immunol*, 2010; 185: 2004-2008.
- [198] Amir AL, D'Orsogna LJ, Roelen DL et al. Allo-HLA reactivity of virus-specific memory T cells is common. *Blood*, 2010; 115: 3146-3157.
- [199] Li Q, Rao RR, Araki K et al. A central role for mTOR kinase in homeostatic proliferation induced CD8+ T cell memory and tumor immunity. *Immunity*, 2011; 34: 541-553.
- [200] Minamimura K, Sato K, Yagita H et al. Strategies to induce marked prolongation of secondary skin allograft survival in alloantigen-primed mice. *Am J Transplant*, 2008; 8: 761-772.
- [201] Weichhart T, Haidinger M, Katholnig K et al. Inhibition of mTOR blocks the anti-inflammatory effects of glucocorticoids in myeloid immune cells. *Blood*, 2011; 117: 4273-4283.
- [202] Haidinger M, Poglitsch M, Geyeregger R, et al. A versatile role of mammalian target of rapamycin in human dendritic cell function and differentiation. *J Immunol*, 2010; 185: 3919-3931.
- [203] Zand MS. Immunosuppression and immune monitoring after renal transplantation. *Semin Dial*, 2005; 18: 511-519.
- [204] Kauffman HM, Cherikh WS, Mc Bride MA et al. Post-transplant de novo malignancies in renal transplant recipients: The past and present. *Transpl Int*, 2006; 19: 607-620.
- [205] Collet D, Mumford L, Banner NR et al. Comparison of the incidence of malignancy in recipients of different types of organ: a UK Registry audit. *Am J Transplant*, 2010; 10: 1889-1896.
- [206] Webster AC, Wong G, Craig JC et al. Managing cancer risk and decision making after kidney transplantation. *Am J Transplant*, 2008; 8: 2185-2191.

- [207] Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson DT et al. Cancer after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant*, 2004; 4: 905-913.
- [208] Vajdic CM, Mc Donald SP, Mc Credie MR et al. Cancer incidence before and after kidney transplantation. *JAMA*, 2006; 296: 2823-2831.
- [209] Karagas MR, Cushing GL, Jr, Greenberg ER et al. Non-melanoma skin cancers and glucocorticoid therapy. *Br J Cancer*, 2001; 85: 683-686.
- [210] Buchbindet R, Barber M, Heuzenroeder L et al. Incidence of melanoma and other malignancies among rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate. *Arthritis Rheum*, 2008; 59: 794-799.
- [211] Carroll RP, Ramsay HM, Fryer AA et al. Incidence and prediction of nonmelanoma skin cancer post-renal transplantation: A prospective study in Queensland, Australia. *Am J Kidney Dis*, 2003; 41: 676-683.
- [212] Ramsay HM, Fryer AA, Reece S et al. Clinical risk factors associated with nonmelanoma skin cancer in renal transplant recipients. *Am J Kidney Dis*, 2000; 36: 167-176.
- [213] Euvrard S, Kanitakis J, Decuiller E et al. Subsequent skin cancers in kidney and heart transplant recipients after the first squamous cell carcinoma. *Transplantation*, 2006; 81: 1093-1100.
- [214] Veness MJ, Quinn DI, Ong CS et al. Aggressive cutaneous malignancies following cardiothoracic transplantation: The Australian experience. *Cancer*, 1999; 85: 1758-1764.
- [215] Lindelof B, Sigurgeirsson B, Gabel H et al. Incidence of skin cancer in 5356 patients following organ transplantation. *Br J Dermatol*, 2000; 143: 513-519.
- [216] Ha T-Y. The Role of Regulatory T Cells in Cancer. *Immune network*, 2009; 9: 209-235.
- [217] Ducloux D, Kazory A, Chalopin J-M. Coronary disease in renal transplantation: how to take charge and assess the risk coronary? *In: P. Lesavre, T. Drüeke, C. Legendre, P.*

Niaudet, J-P. Grünfeld. Actual Nephrol Necker, Flammarion Medecine-Sciences, 2007: 91-104.

[218] Mallat Z, Besnard S, Duriez M et al. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res*, 1999; 85: e17-e24.

[219] Robertson AK, Rudling M, Zhou X et al. Disruption of TGF-beta signaling in T cells accelerates atherosclerosis. *J Clin Invest*, 2003; 112: 1342-1350.

[220] Ducloux D, Deschamps M, Yannaraki M et al. Relevance of Toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation. *Kidney Int*, 2005; 67: 2454-2461.

[221] Tupin E, Nicoletti A, Elhage R et al. CD1d-dependent activation of NKT cells aggravates atherosclerosis. *J Exp Med*, 2004; 199: 417-422.

[222] Zuber J, Fritz D, Mariat C et al. Clinical monitoring of the immune responses in kidney transplantation. In: P Lesavre. Actual Nephrol Necker, Médecine Sciences Publications/Lavoisier, 2013: 175-180.

[223] Lin WX, Christiansen D, Fu LL et al. Foxp3+ T cells in peripheral blood of renal transplant recipients and clinical correlations. *Nephrology*, 2012; 17: 415-422.

[224] Descamps-Latscha B, Chatenoud L. T cells and B cells in chronic renal failure. *Semin Nephrol*, 1996; 16: 183-191.

[225] Girndt M, Sester U, Sester M et al. Impaired cellular immune function in patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant*, 1999; 14: 2807-2810.

[226] Kreijveld E, Koenen HJ, Van Cranenbroek B et al. Immunological monitoring of renal transplant recipients to predict acute allograft rejection following the discontinuation of tacrolimus. *PLoS ONE*, 2008; 3: e2711.

[227] Mittal SK, Sharma RK, Gupta A et al. Increased interleukin-10 production without expansion of CD4+CD25+ T-regulatory cells in early stable renal transplant patients on calcineurin inhibitors. *Transplantation*, 2009; 88: 435-441.

- [228] Zuber J, Grimbert P, Blanco G et al. Prognostic significance of graft Foxp3 expression in renal transplant recipients: a critical review and attempt to reconcile discrepancies. *Nephrol Dial Transplant*, 2013; 5: 1100-1111.
- [229] Oberbauer R, Segoloni G, Campistol GM et al. Early cyclosporine withdrawal from a sirolimus-based regimen results in better renal allograft survival and renal function at 48 months after transplantation. *Transplantation Int*, 2005; 18: 22-28.
- [230] Sampaio E, Pinheiro-Machado PG, Garcia R et al. Mycophenolate mofetil vs sirolimus in kidney transplant recipients receiving tacrolimus-based immunosuppressive regimen. *Clin Transplantation*, 2008; 22: 141-149.
- [231] Tedesco-Silva J, Cibrik D, Johnston T et al. Everolimus Plus Reduced-Exposure CsA versus Mycophenolic Acid Plus Standard-Exposure CsA in Renal Transplant Recipients. *Am J Transplant*, 2010; 10: 1401-1413.
- [232] Büchler M, Caillard S, Barbier S et al. Sirolimus Versus Cyclosporine in Kidney Recipients Receiving Thymoglobulin, Mycophenolate Mofetil and a 6-Month Course of Steroids. *Am J Transplant*, 2007; 7: 2522-2531.
- [233] Schena FP, Pascoe MD, Alberu J et al. Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus maintenance therapy in renal allograft recipients: 24-month efficacy and safety results from the CONVERT Trial. *Transplantation*, 2009; 87: 233-242.
- [234] Budde K, Becker T, Arns W et al. Everolimus-based, calcineurin-inhibitor-free regimen in recipients of de-novo kidney transplants: an open-label, randomised, controlled trial. *Lancet*, 2011; 377: 837-847.
- [235] Weir MR, Mulgaonkar S, Chan L et al. Mycophenolate mofetil-based immunosuppression with sirolimus in renal transplantation: a randomized, controlled Spare-the-Nephron trial. *Kidney Int*, 2011; 79: 897-907.

- [236] Lebranchu Y, Thierry A, Toupance O et al. Efficacy on Renal Function of Early Conversion from Cyclosporine to Sirolimus 3 Months After Renal Transplantation: Concept Study. *Am J Transplant*, 2009; 9: 1115-1123.
- [237] Halimi J-M, Büchler M, Al-Najjar A et al. Urinary Albumin Excretion and the Risk of Graft Loss and Death in Proteinuric and Non-proteinuric Renal Transplant Recipients. *Am J Transplant*, 2007; 7: 618-625.
- [238] Chapman JR, O'Connell PJ, Nankivell BJ. Chronic Renal Allograft Dysfunction. *J Am Soc Nephrol*, 2005; 16: 3015-3026.
- [239] Graham I, Borch-Johnsen K, Boysen G et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary. Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (Constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur Heart J*, 2007; 28: 2375-2414.
- [240] Schiffrin EL. T lymphocytes : a role in hypertension? *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2010; 19: 181-186.
- [241] Mausner-Fainberg K, Luboshits G, Mor A et al. The effect of HMG-CoA reductase inhibitors on naturally occurring CD4+CD25+ T cells. *Atherosclerosis*, 2008; 197: 829-839.
- [242] Guillen D, Cofan F, Ros E et al. Biomarker assessment of the immunomodulator effect of atorvastatin in stable renal transplant recipients and hypercholesterolemic patients. *Mol Diagn Ther*, 2010; 14: 357-366.
- [243] Pallet N, Rabant M, Legendre C et al. The nephroprotective properties of Recombinant Human Erythropoietin in Kidney Transplantation : experimental facts and clinical proofs. *Am J Transplant*, 2012; 12: 3184-3190.
- [244] Cravedi P, Manrique J, Hanlon KE et al. Immunosuppressive effects of Erythropoietin on Human Alloreactive T cells. *J Am Soc Nephrol* (2014) Mar 27.

[245] Bover J, Da Silva I, Furlano M et al. Clinical Uses of 1,25-dihydroxy-19-nor-vitamin D2 (Paricalcitol). *Curr Vasc Pharmacol*, 2013; 11: 000-000.

[246] Quang Truong D, Darwish AA, Gras J et al. Immunological monitoring after organ transplantation: Potential role of soluble CD30 Blood level measurement. *Transplant Immunology*, 2007; 17: 283-287.

[247] Wieërs G, Gras J, Bourdeaux C et al. Monitoring tolerance after human liver transplantation. *Transplant Immunology*, 2007; 17: 83-93.

[248] Quang Truong D, Bourdeaux C, Wieërs G et al. The immunological monitoring of kidney and liver transplants in adult and pediatric recipients. *Transplant Immunology*, 2009; 22: 18-27.

[249] Herrera F, Nocito M, Martin D et al. Immunological tolerance and protection against allograft rejection. National Congress of the Spanish Society of Dialysis and Transplantation (SEDYT) 2013, Bilbao.

**Primer premio a la mejor comunicación presentada al congreso de la SEDYT 2013.**