

# Células T reguladoras y tolerancia en trasplante: Efecto de la inmunosupresión farmacológica

D. San Segundo<sup>1</sup>, M.J. Benito<sup>1</sup>, G. Fernández-Fresnedo<sup>2</sup>, M.J. Marín<sup>1</sup>, M. Arias<sup>2</sup>, M. López-Hoyos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicios de Immunología y <sup>2</sup>Nefrología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander.

## REGULATORY T CELLS AND TOLERANCE IN TRANSPLANTATION: EFFECT OF IMMUNOSUPPRESSION

Recibido: 10 Septiembre 2007

Aceptado: 17 Septiembre 2007

### RESUMEN

El beneficio sustancial que supone el trasplante en aquellos pacientes con enfermedades terminales se contrarresta por la tasa moderada de supervivencia del injerto a largo plazo. Esto se debe en gran medida a los fármacos inmunosupresores que inhiben inespecíficamente la respuesta inmunitaria para evitar el rechazo pero que acarrearán gran número de efectos adversos responsables del rechazo crónico. Por ello, el principal objetivo en el trasplante es alcanzar una ausencia de respuesta inmunitaria frente a los aloantígenos del donante sin necesidad de administraciones prolongadas de fármacos inmunosupresores. En los últimos años, las células T reguladoras, sobre todo aquellas que muestran el fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> (conocidas como células Tregs), han demostrado su capacidad de controlar las respuestas inmunitarias frente a aloantígenos del donante, por lo que poseen un gran potencial en el establecimiento de tolerancia del trasplante *in vivo*. La mayoría de las evidencias proceden de modelos experimentales aunque últimamente han aparecido trabajos que abordan el papel de las células Tregs en el contexto clínico del trasplante. En dicho contexto, un factor esencial a considerar es la presencia de inmunosupresión farmacológica en prácticamente el 100% de los pacientes. Hallazgos recientes demuestran cómo existen fármacos que favorecen la inducción y/o mantenimiento de las células Tregs en pacientes trasplantados. De todos ellos, los inhibidores de mTOR se muestran como los que más favorecen el desarrollo de Tregs en el trasplante de órganos actual. Estrategias que se plantean en un futuro cercano son la estimulación *ex vivo* de células Tregs purificadas con aloantígenos del donante, o incluso la transfección con FOXP3 de células alorreactivas CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>.

**PALABRAS CLAVE:** CD25/ Células Tregs/ FOXP3/ Inmunosupresión/ Tolerancia/ Trasplante.

### ABSTRACT

The poor long-term graft survival rate counteracts the important advance that transplantation is for end-stage disease patients. This is mainly due to the use of immunosuppressants that non-specifically inhibit the immune response to avoid graft rejection but that bring a number of adverse effects leading to chronic rejection. Thus, the major goal in transplant medicine is to reach an absence of immune response towards donor alloantigens without the need of long-term immunosuppressant drugs. In the last years, regulatory T cells, mainly those with a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> phenotype (named as Treg cells), have demonstrated an inhibitory effect on immune responses against donor alloantigens. As a consequence, they are a potential tool in the development of transplant tolerance *in vivo*. Most of the evidence comes from experimental models, although recent works address the role of Treg cells in the clinical setting of transplantation. In such a setting, the coexistence of immunosuppression in almost 100% of the patients is an essential factor to consider. Recent findings show that different drugs favour the induction and/or maintenance of Treg cells in transplant recipients. Among them, mTOR inhibitors seem to promote the development of Treg cells at present. Next strategies include the *ex vivo* stimulation of sorted Treg cells with donor alloantigens or the transfection of alloreactive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells with FOXP3.

**KEY WORDS:** CD25/ FOXP3/ Immunosuppression/ Tolerance/ Transplantation/ Treg cells.

El trasplante de órganos es hoy una alternativa terapéutica perfectamente establecida para el tratamiento de pacientes con disfunción orgánica terminal e irreversible de muy diversas causas<sup>(1)</sup>. La inmunosupresión farmacológica ha supuesto el motor del desarrollo clínico del trasplante de órganos sólidos fundamentalmente debido a la supresión de las reacciones inmunitarias que se desencadenan en toda situación de rechazo, especialmente el agudo<sup>(2)</sup>. De hecho, el éxito clínico del trasplante se ha basado sobre todo en el control del rechazo agudo que alcanza actualmente cifras superiores al 90% en el trasplante renal<sup>(3)</sup>. A pesar de los enormes logros conseguidos durante los últimos años en el manejo clínico de los pacientes sometidos a trasplante de un órgano sólido, el fracaso a largo plazo del injerto continúa siendo el obstáculo principal para el éxito de esta terapéutica<sup>(3,4)</sup>. En efecto, si las supervivencias al año de los aloinjertos renales, cardíacos y hepáticos se hallan entre un 85 y un 95%, cuando transcurren 10-12 años, estas cifras descienden notablemente, situándose en el caso de los trasplantes cardíacos en un 60%<sup>(5)</sup>. En el caso de los trasplantes renales, la principal causa de pérdida a largo plazo se debe a lo que se denomina nefropatía crónica del trasplante (NCT), cuya forma severa se presenta en el 58% de los pacientes trasplantados<sup>(6)</sup>. Esta nefropatía se caracteriza por disfunción renal progresiva acompañada de fibrosis crónica intersticial, atrofia tubular, cambios vasculares oclusivos y glomeruloesclerosis<sup>(7)</sup>. La fisiopatología de esta nefropatía es compleja y poco conocida, si bien se distinguen diferentes fases con sus protagonistas celulares y sus correspondientes cambios histológicos, lo que indica que el fracaso del injerto es la consecuencia de un cúmulo de agresiones que actúan secuencial y aditivamente. Estas agresiones pueden ser de carácter inmunológico, en forma de episodios de rechazo (hiperagudo, agudo y crónico), y de carácter no inmunológico que van desde los factores pre-trasplante propios del paciente a los daños peritrasplante<sup>(8,9)</sup>. Otra forma de diferenciar los factores implicados en el desarrollo de NCT es en aquellos dependientes (NCT, muerte con injerto funcionante por cáncer, infecciones o enfermedad cardiovascular) e independientes (aumento de la edad del donante y receptor, empleo de órganos subóptimos) de la inmunosupresión<sup>(8,9)</sup>.

El término NCT se acuñó a principios de los años 90. Desde entonces su uso se ha extendido y como se ha comentado anteriormente se emplea para todos los tipos de disfunción crónica del injerto. Por ello, la tendencia actual es a desechar la terminología de NCT por una más morfológica. Así, la conferencia de Banff estableció el término histológico de fibrosis intersticial y atrofia tubular para sustituir al de NCT<sup>(10)</sup>. Bajo esta nueva terminología se sigue diferenciando, como en la NCT, el daño crónico aloinmunitario del no

inmunitario, aunque con variaciones histológicas que diferencian la causa específica<sup>(10)</sup>.

## INMUNOSUPRESIÓN EN EL TRASPLANTE DE ÓRGANOS SÓLIDOS

El tratamiento inmunosupresor es imprescindible para el éxito de los trasplantes. La introducción de los fármacos inhibidores de la calcineurina revolucionó los resultados a corto plazo<sup>(3,4)</sup>. Sin embargo, la cantidad de inmunosupresión que se emplea para cada paciente se decide con base en datos clínicos, histológicos y farmacocinéticos, sabiendo que conseguimos bloquear una respuesta inmunitaria de forma global, pero sin tener la certeza de qué es lo que necesitamos bloquear<sup>(2)</sup>. Además, el tratamiento es de por vida y responsable de los efectos adversos que aparecen a largo plazo y que causan en gran medida la pérdida del injerto<sup>(11)</sup>.

La misión principal del sistema inmunitario es defender a nuestro organismo frente a las agresiones externas por parte de los microorganismos y toxinas. Además, debe reconocer otros antígenos propios pero que se han modificado por acción de infecciones o de neoplasias. Por otra parte, tiene que mantener la capacidad de no responder o tolerar aquellos antígenos que se generan de forma fisiológica durante nuestro desarrollo (pubertad, lactancia, envejecimiento...) o con los que entramos en contacto a diario (flora comensal, alimentos...). El alotrasplante es considerado por el sistema inmunitario como extraño y, por lo tanto, monta una respuesta frente a él en forma de rechazo<sup>(12)</sup>. Cuando se administra la inmunosupresión farmacológica en un paciente trasplantado, no sólo se inhibe la capacidad de responder frente al aloinjerto, sino que también se suprime el resto de respuestas que protegen al organismo frente a las agresiones (infecciones, tumores...). Esta falta de selectividad inmunológica es la responsable del desarrollo de un estado de inmunodeficiencia y de la alta tasa de neoplasias, junto con otros efectos adversos que provocan la pérdida a largo plazo del aloinjerto<sup>(13)</sup>. Por ello, el reto más importante en la investigación inmunológica en el trasplante de órganos es el esclarecimiento y la manipulación terapéutica de los mecanismos de inducción de tolerancia. La principal ventaja de la tolerancia inmunológica es la de la especificidad, puesto que sería capaz de mantener la respuesta frente a microorganismos y tumores mientras que no reaccionaría frente al órgano trasplantado. Dado que se trata de un mecanismo no farmacológico, no acarrearía los efectos adversos de la medicación y, por lo tanto, los beneficios a largo plazo serían claros. Actualmente, el gran impedimento que tiene desde el punto de vista práctico es la falta de

marcadores clínicos que permitan establecer y monitorizar el estado de tolerancia<sup>(14,15)</sup>. Los mecanismos que participan en la tolerancia de aloantígenos son, en principio, los mismos que frente a los autoantígenos: delección central de células T alorreactivas, delección o anergia periférica de células T alorreactivas, la ignorancia periférica por las células T alorreactivas o la supresión activa de células T alorreactivas<sup>(16,17)</sup>. De todos estos mecanismos sólo la supresión ha dirigido sus esfuerzos a generar un tipo de célula T encargado de controlar las respuestas de otras células T. En los últimos años ha adquirido un interés especial el estudio de poblaciones celulares con actividad supresora/reguladora.

### CÉLULAS T REGULADORAS

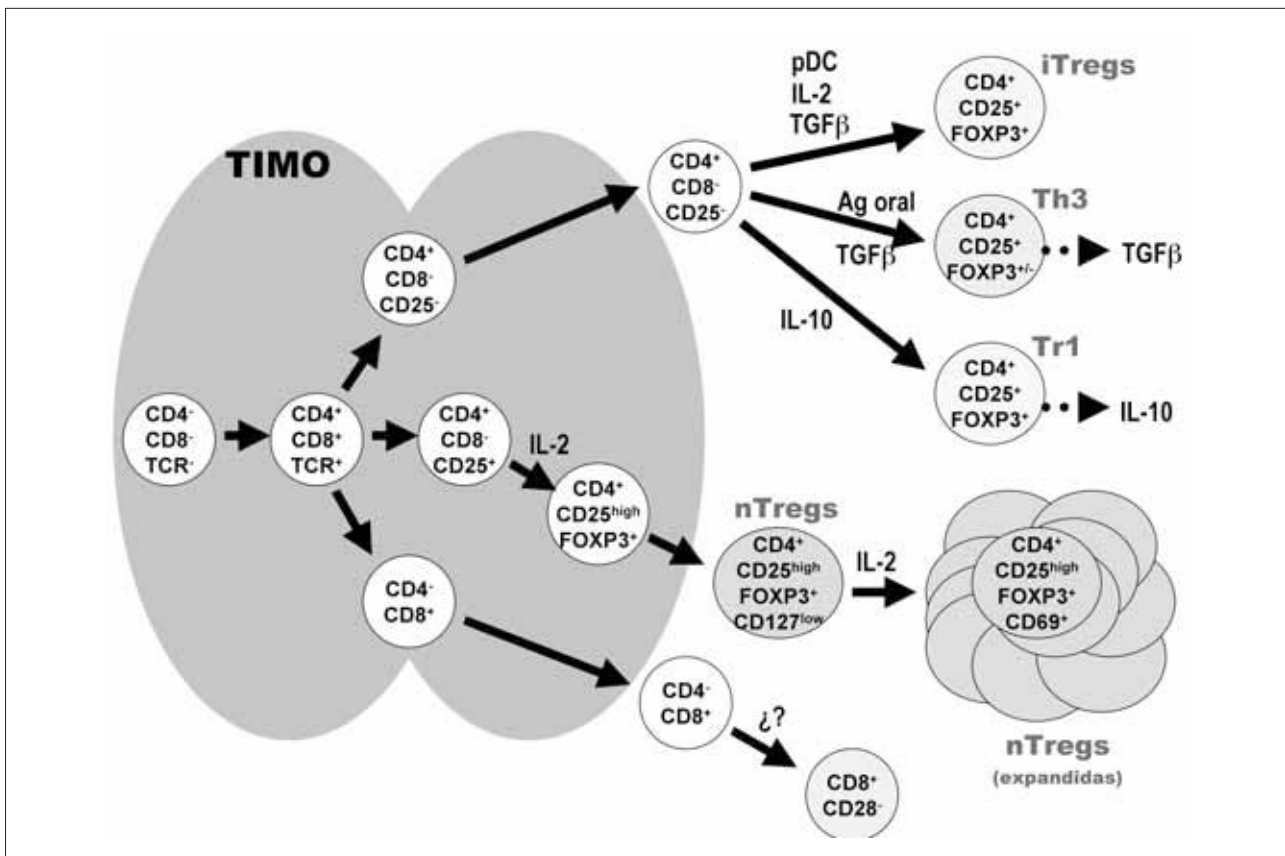
Las células T “supresoras”, capaces de suprimir respuestas antígeno-específicas y de transferir esa tolerancia a otros animales, se identificaron hace 30 años<sup>(18)</sup>. Estas células tuvieron un gran auge en la segunda mitad de la década de los 80, cuando se consiguieron establecer hibridomas de células T supresoras *in vitro* y se definieron redes complejas de células T supresoras. Sin embargo, este tipo de células cayó en el ostracismo por parte de los inmunólogos, debido al hallazgo de la ausencia del determinante I-J en el locus MHC del ratón, que se había establecido como característico de esta población celular. Tampoco se demostraron reordenamientos de las cadenas alfa o beta del TCR<sup>(19)</sup>. Por todo ello, las células T supresoras se convirtieron en un tabú en inmunología, aunque la posibilidad de transferir tolerancia entre dos individuos no pudo ser rebatida en ningún momento<sup>(19)</sup>.

Sakaguchi reintrodujo el concepto de células T supresoras o reguladoras (Treg), en un modelo de enfermedad autoinmune inducida tras timectomizar a ratones a los tres días de edad<sup>(20)</sup>. En estos ratones se demostró la ausencia de una población T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, que suponía el 5-10% del bazo y que, cuando se transferían de un ratón normal al timectomizado, evitaban el desarrollo de la enfermedad<sup>(20)</sup>. Además de su papel en modelos de autoinmunidad, el papel regulador de estas células ha demostrado también efectos beneficiosos en la reacción de injerto frente a hospedador (GVHD) o en el trasplante de islotes pancreáticos<sup>(21,22)</sup>.

El primer problema que existe con las células Treg es su identificación, dado que se han descrito diversas poblaciones inmunocompetentes con actividad reguladora<sup>(23-25)</sup>. Las más estudiadas son las células T con fenotipo CD4CD25, habiéndose observado también funciones reguladoras en células T CD8<sup>+</sup>, células T gamma-delta, células NK, células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, o células NKT (Figura 1). Cada una de estas poblaciones celulares tiene distintos receptores celulares, ejercen su

función mediante distintos mecanismos y actúan en distintos estadios de la respuesta inmunitaria<sup>(23-25)</sup>. Las principales evidencias del papel de estas células en los mecanismos de tolerancia provienen de modelos animales donde se ha observado cómo las células CD8 supresoras ayudan a la discriminación entre lo propio y no propio y se diferencian durante la respuesta inmunitaria primaria para suprimir las respuestas secundarias y de memoria<sup>(26)</sup>. Por otro lado, otro tipo de células CD8<sup>+</sup> supresoras, las células CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, reconocen complejos péptidos/MHC-I en las células dendríticas convirtiéndolas en tolerogénicas mediante la expresión de moléculas inhibitoras como ILT3 o ILT4 (“immunoglobulin like transcripts”). ILT3 e ILT4 interfieren con la inducción de moléculas coestimuladoras en las células presentadoras de antígeno y tolerizan a las células T CD4<sup>+</sup> helper<sup>(27,28)</sup>. Por último, las células NKT y CD4<sup>+</sup> se generan antes del contacto con el antígeno y actúan en las etapas tempranas de la respuesta innata y primaria, respectivamente. En concreto las células NKT que expresan receptores propios de células NK y el TCRαβ, el cual reconoce los complejos CD1d/glicolípidos<sup>(29,30)</sup>. Los mecanismos mediante los que las células NKT regulan la inducción de tolerancia son complejos pero parecen interaccionar con las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> reguladoras y actuar mediante la secreción de citocinas supresoras (IL-4, IL-10 y TGF-β)<sup>(31,32)</sup>.

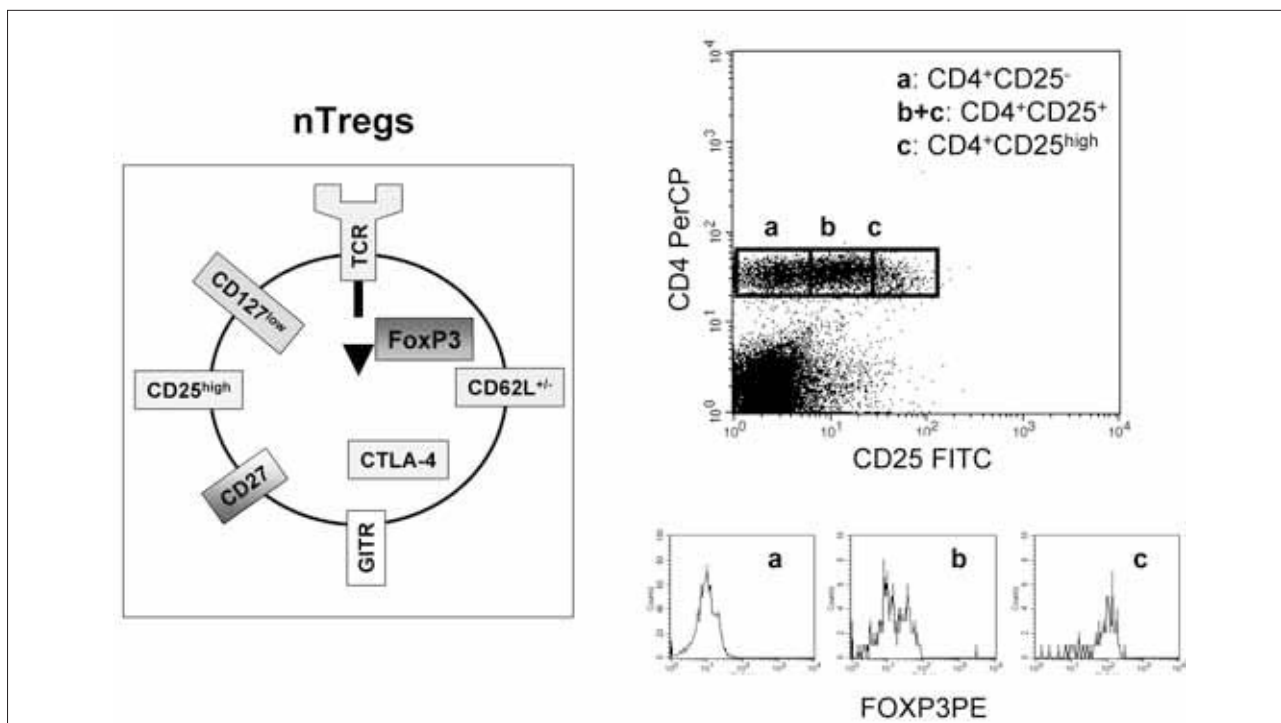
Respecto al trasplante de órganos y a su importancia en los mecanismos inductores de tolerancia, de todas las poblaciones celulares con capacidad reguladora/supresora que aparecen en la Figura 1, la que más interés atrae es la de los linfocitos T reguladores que expresan CD25 (cadena alfa del receptor de IL-2), conocidas como células Tregs. La expresión de esta molécula es muy elevada en las células Tregs humanas, por lo que se las define como células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>, en contraposición a las células T CD4<sup>+</sup> efectoras recién activadas, en las que la expresión es más baja y transitoria<sup>(33,34)</sup>. Se han descrito otros marcadores cuya expresión sirve para definir y seleccionar la población de células Tregs como CD45RB, CTLA-4, GITR o TNFRSF18 (“glucocorticoid-induced TNF receptor family-related receptor”), CD134 (OX40) o CD62L<sup>(33-35)</sup>. Como ocurre con CD25, ninguna de esas moléculas se expresa de forma exclusiva en las células Tregs. En cambio, la expresión del factor de transcripción FOXP3 en estas células se emplea como definitoria<sup>(34-36)</sup>. Las mutaciones en el gen de FOXP3 causan un síndrome autoinmune letal en el ratón Scurfy y son responsables del síndrome humano IPEX (disregulación inmunitaria, poliendoocrinopatía y enteropatía ligada al cromosoma X)<sup>(37-39)</sup>. Tanto los ratones Scurfy como los pacientes con IPEX muestran cantidades muy bajas de células Tregs y una función supresora de esas células



**Figure 1.** Esquema representativo de los principales tipos de células T reguladoras con capacidad de control de una respuesta aloinmunitaria. La población de células T reguladoras naturales (nTregs) es la única que se diferencia en el timo y de ahí sale a la periferia con un fenotipo específico. En cambio, las células T reguladoras inducidas (iTregs), que también tienen el factor de transcripción FOXP3, se generan en la periferia a partir de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FOXP3<sup>-</sup> naïve cuando el antígeno se presenta por células dendríticas plasmocitoides (pDC) en presencia de concentraciones determinadas de citocinas como IL-2 o TGF- $\beta$ . Las células Tr1 y las células Th3 también se generan fuera del timo a partir de las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FOXP3<sup>-</sup> naïve y no se diferencian por ningún marcador específico concreto, sino por la secreción de IL-10 y TGF- $\beta$ , respectivamente. Las células T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> también tienen un papel de control de las respuestas alogénicas, aunque no se conoce exactamente como se diferencian.

defectuosa<sup>(37-39)</sup>. La diferenciación de la mayoría de células Tregs periféricas comienza en el timo tras la inducción de la expresión de FOXP3 en un subtipo de timocitos TCR $\alpha\beta$  con elevada afinidad por los complejos autoantígeno-MHC<sup>(40)</sup>. Estas células se conocen como células Tregs naturales (nTregs), en contraposición a las células Tregs que se pueden inducir (células iTregs) en condiciones específicas *in vitro*, como la presentación del antígeno por células dendríticas plasmocitoides en presencia de IL-2 y TGF- $\beta$  (Figura 1). La transfección de FOXP3 en células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> las convierte en células con capacidad supresora y, por otro lado, la hiperexpresión de un transgén de FOXP3 en ratones confiere capacidad supresora a las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> y CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, lo cual indica que la expresión de FOXP3 modula la capacidad funcional de las células Tregs<sup>(41,42)</sup>. Este efecto parece ser dosis-dependiente puesto que sólo la disminución de expresión de FOXP3 es capaz de transformar células con función

reguladora en función efectora<sup>(43)</sup>. A pesar de ello, no se conoce aún el mecanismo molecular mediante el que FOXP3 media la capacidad supresora, pudiendo ser tanto por la inhibición directa de la señalización a través del TCR o, de forma indirecta, mediante la transcripción de un factor que inhiba las señales inducidas por la señalización a través del TCR<sup>(44)</sup>. La importancia de FOXP3 parece radicar en su capacidad de amplificar y estabilizar la transcripción de genes específicos de regulación, lo que mantiene la homeostasis de las células Tregs, más que iniciar la generación de células Tregs<sup>(45)</sup>. Por otro lado, ha aparecido cierto debate acerca de la utilidad de FOXP3 como marcador de células Tregs puesto que se ha descrito que FOXP3 se induce tras la estimulación a través del TCR y se duda de si la población inducida CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> es supresora o anérgica<sup>(46)</sup>. De hecho, FOXP3 se restringe a la población de células Tregs en ratones, pero no en humanos, donde se expresa no sólo en células



**Figure 2.** Marcadores fenotípicos característicos de las células Tregs naturales (nTregs). A la izquierda de la figura se representan las moléculas de superficie que definen el fenotipo de células nTreg. Además, la expresión intracelular del factor de transcripción FOXP3 y de CTLA-4 se consideran marcadores específicos. De entre todos los marcadores mostrados, la expresión de altos niveles de CD25 se ha empleado como el marcador más característico de las células nTregs, como muestra la citometría de la parte superior derecha. La citometría de flujo de la parte inferior derecha muestra como la población CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> (región c) es la que expresa FOXP3 en comparación con la población CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> (región b, células T CD4<sup>+</sup> activadas) y la CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (región a, células T CD4<sup>+</sup> naïve).

naïve recién activadas sino también en células memoria<sup>(47)</sup>. Recientemente, se ha descrito que la expresión baja del receptor de IL-7 (CD127) sirve de biomarcador de células Tregs, las cuales tienen la mayor capacidad supresora y la mayor expresión de FOXP3 (Figura 2)<sup>(48)</sup>.

Además de esas células Tregs se ha descrito otro tipo de células T CD4<sup>+</sup> reguladoras, las denominadas Tr1. Estas células se generan en la periferia a partir de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naïve tras la estimulación antigénica en condiciones de coestimulación limitantes. Entre los factores inductores mejor establecidos están la IL-10 y las células dendríticas inmaduras<sup>(49,50)</sup>. Mientras que las células Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> actúan a través del contacto celular, las Tr1 lo hacen a través de citocinas supresoras como IL-10 y TGF-β. Por otro lado, las células Tr1 parecen no expresar FOXP3. No existen marcadores de superficie celular que las identifiquen, aunque se distinguen de las células Th2 por el patrón de citocinas que secretan (IL-2<sup>low</sup>IL-4<sup>+</sup>IL-5<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>TGFβ<sup>+</sup>). Además, mientras que las células nTregs migran a los ganglios linfáticos (por ello expresan niveles elevados de CD62L), las células Tr1 migran hacia sitios de inflamación<sup>(49,50)</sup>. Las células Tr1 suprimen las respuestas de células T naïve y memoria así

como la expresión de moléculas coestimuladoras y la secreción de citocinas proinflamatorias de las células presentadoras de antígeno. La inducción y activación inicial de estas células es antígeno-dependiente pero, una vez activadas, su capacidad supresora no es específica de antígeno<sup>(49,50)</sup>.

Existe un segundo tipo de células T CD4<sup>+</sup> reguladoras inducidas que se denominan Th3 y que son superponibles a las Tr1 en muchas características, salvo que secretan TGF-β<sup>(51)</sup>. Curiosamente, se ha descrito cómo TGF-β, mediadora de los efectos de las células Th3, es capaz de convertir células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> no reguladoras en células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> reguladoras induciendo la expresión de FOXP3<sup>(52,53)</sup>. Al igual que con las células Tr1, tampoco existen marcadores fenotípicos que las identifiquen. La presente revisión no pretende profundizar en las células Tr1 y Th3 (excelente revisión en 50).

## CÉLULAS T REGULADORAS Y TRASPLANTE

En el trasplante de órganos sólidos se han descrito dos tipos de reconocimiento de aloantígenos: el directo y el indirecto<sup>(12)</sup>. En el primer tipo se reconocen las moléculas MHC intactas presentadas por las células presentadoras de



antígeno (APC) del donante. El reconocimiento directo se considera que juega su papel fundamental en la primera fase del alotrasplante y mediaría el rechazo agudo. El aloreconocimiento indirecto consistiría en el procesamiento de moléculas MHC o antígenos menores de histocompatibilidad del donante presentados por las APC del receptor<sup>(12)</sup>. Dado que las células APC del donante que participan en el reconocimiento directo tienen una supervivencia limitada, se supone que el reconocimiento indirecto, dependiente de las APC del receptor, jugaría un papel más importante en la alorespuesta a largo plazo<sup>(54)</sup>. Además, el reconocimiento indirecto ha sido identificado últimamente como el mecanismo de acción de las células Treg<sup>(55,56)</sup>. Las primeras evidencias a favor de esta hipótesis eran la inhibición de respuestas aloantígeno-específicas mediante la administración de alo péptidos vía oral<sup>(57)</sup> o el mejor resultado de trasplantes renales tras una transfusión sanguínea pre-trasplante en la que se compartía al menos un alelo HLA, comparado con los que no compartían ningún alelo<sup>(58)</sup>. Sin embargo, muy recientemente han aparecido evidencias a favor de la influencia de las Tregs en el control de la respuesta inmunitaria del rechazo agudo *in vivo*<sup>(59)</sup>. Así, se han demostrado infiltrados de células Tregs en el riñón de pacientes trasplantados renales que sufren rechazo agudo celular pero no humoral<sup>(60)</sup>. Algunos autores han hipotetizado que la presencia de estos infiltrados de células reguladoras tendrían la misión de contrarrestar el efecto de las células efectoras alorreactivas<sup>(60)</sup>. Además, estos infiltrados tisulares parecen acompañarse de un descenso de las células Tregs en sangre<sup>(61)</sup>. Otros autores han sugerido que las células Tregs pueden suprimir el reconocimiento directo en ausencia de reconocimiento indirecto, pero ese efecto necesitaría un número elevado de células Tregs<sup>(56)</sup>.

La inducción de una tolerancia efectiva por parte de las células Tregs no sólo debe ir dirigida frente a las células T que reconocen los mismos aloantígenos, sino que esas células Tregs deben suprimir respuestas frente a otros aloantígenos del donante. Además, esas respuestas no sólo serán mediadas por células T CD4<sup>+</sup>, sino por células CD8<sup>+</sup> o NK. En modelos experimentales se ha demostrado una capacidad supresora excelente de la respuesta CD8<sup>+</sup> citolítica y productora de IFN- $\gamma$  precisa para el rechazo de aloantígenos, a pesar de favorecer la persistencia y acumulación de esas células CD8<sup>+</sup> alorreactivas<sup>(62)</sup>. Existe, por último, el fenómeno de "anergia ligada", por la cual las células T reguladoras generadas mediante reconocimiento indirecto de un aloantígeno, son capaces de regular respuestas frente a otros aloantígenos, mediante la vía directa o indirecta, de un modo no específico<sup>(54, 63)</sup>.

Dado el potencial que tienen las células Tregs en el control de las alorespuestas en el trasplante de órganos, uno de

los objetivos actuales es determinar si la monitorización de estas células puede servir de marcador de tolerancia inmunológica. Para ello, el primer paso consiste en determinar cómo se regula el número de estas células *in vivo*. Nuestro grupo ha estudiado la evolución de los números absolutos de células Tregs sanguíneas en pacientes trasplantados renales durante el primer año después del trasplante. Los datos muestran un descenso de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> a los seis meses del trasplante para recuperarse parcialmente al año, aunque no alcanzan los niveles previos al trasplante<sup>(61)</sup>. A los dos años del trasplante, las células Treg aumentan y superan incluso los niveles basales (M.L.H. et al, manuscrito en preparación). Como ya se ha comentado anteriormente, es probable que el descenso inicial en sangre se corresponda con la infiltración tisular de las células durante el rechazo del injerto que suele ocurrir en los primeros seis meses del trasplante<sup>(60)</sup>. De hecho, aquellos pacientes que sufren rechazo agudo muestran un menor número de células Tregs sanguíneas que los que no lo sufren<sup>(61)</sup>. No obstante, un factor esencial a considerar en el trasplante en humanos, a diferencia de los modelos experimentales animales, es la influencia de múltiples factores ambientales y genéticos no controlados. Entre ellos, el que más destaca es el posible efecto de la inmunosupresión farmacológica a la que están sometidos los pacientes trasplantados de por vida. Por ello, una de las líneas de investigación más activas es la identificación de regímenes inmunosupresores que faciliten la generación y/o el mantenimiento de las células Tregs<sup>(64)</sup>.

No existen muchos datos acerca de la modulación de las células Tregs en el trasplante de otros órganos. En el caso del trasplante hepático, recientemente se ha descrito un traspaso de abundantes células Tregs desde el injerto a la circulación del receptor, que genera un microquimerismo necesario para evitar el rechazo del injerto hepático en los primeros momentos del trasplante<sup>(65)</sup>. Más tarde en la evolución del trasplante hepático las células Treg parecen ser responsables en parte de la tolerancia operacional, y las cifras de estas células en sangre pueden caer en caso de producirse un episodio de rechazo<sup>(65)</sup>. Las células con fenotipo Treg están disminuidas en receptores de un trasplante pulmonar que sufren rechazo crónico en forma de bronquiolitis obliterante respecto a aquellos que se mantienen estables<sup>(66)</sup>. En el trasplante de médula ósea diversos trabajos correlacionan los niveles de células Tregs con el desarrollo de reacción injerto contra huésped, con resultados contradictorios y de difícil comparación. Unos estudios demuestran una correlación positiva entre las cifras de células Tregs circulantes y una reducción de los episodios de reacción injerto contra huésped<sup>(67,68)</sup>, otros encuentran lo opuesto<sup>(69)</sup>. El grupo de

Roncarolo ha iniciado ensayos clínicos en los que emplean las células Tr1 para la prevención de la reacción injerto contra huésped en el trasplante de médula ósea, en el que este subtipo de célula T reguladora parece jugar un papel más importante<sup>(70)</sup>. De todos modos, los datos de monitorización de células Tregs en el contexto clínico son aún escasos y se precisan más evidencias para determinar la utilidad clínica de su monitorización.

## MODULACIÓN DE LAS CÉLULAS Tregs POR LA INMUNOSUPRESIÓN FARMACOLÓGICA

Como ya se ha adelantado, un factor a considerar respecto a las células Tregs en el trasplante de órganos sólidos es la coexistencia siempre con fármacos inmunosupresores, esenciales para evitar sobre todo las crisis de rechazo agudo. Los estudios animales muestran a las células Tregs específicas de donante como el elemento esencial de la tolerancia en el trasplante al suprimir los efectos citotóxicos de las células T efectoras, en contraposición a la supresión que se consigue con los fármacos inmunosupresores. Sin embargo, tolerancia e inmunosupresión no deben considerarse como dos extremos sin conexión dentro del trasplante, sino que se pueden conseguir cierto grado de tolerancia en presencia de fármacos inmunosupresores<sup>(71)</sup>. Por ello, las posibles aplicaciones clínicas de las células Tregs en el trasplante de órganos deben explicarse en el contexto de los pacientes, que están recibiendo inmunosupresión de manera crónica. El objetivo es definir aquellos fármacos capaces de suprimir las respuestas de las células T efectoras mientras que mantienen, o incluso potencian, la actividad de las células T reguladoras.

Los inhibidores de la calcineurina (ciclosporina, tacrolimus) y los inhibidores de mTOR (rapamicina, everolimus) son los inmunosupresores más establecidos en la clínica para prevenir el rechazo de aloinjertos<sup>(2)</sup>. En línea con lo argumentado en el párrafo anterior, parece que los inhibidores de mTOR favorecerían la acción de las células Tregs. Así, el grupo de Roncarolo demostró cómo la rapamicina, en presencia de altas dosis de IL-2, induce la proliferación de células Tregs mientras que inhibe la proliferación de las células T efectoras *in vitro*<sup>(72)</sup>. Nuestro grupo mostró por primera vez en un estudio transversal en pacientes trasplantados renales, cómo el tratamiento prolongado con inhibidores de la calcineurina produce un descenso en el número de células Tregs circulantes, mientras que la rapamicina es capaz de conservar esas células en sangre<sup>(73)</sup>. Además, nuestros hallazgos indicaban que el tratamiento con rapamicina era capaz de recuperar los niveles sanguíneos de células Tregs descendidos tras un tratamiento con inhibidores de la calcineurina. Es decir, la ciclosporina y el tacrolimus tienen

un efecto deletéreo sobre las células Tregs, aunque la capacidad supresora y los niveles de expresión de FOXP3 son semejantes en las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> de ambos grupos de pacientes, tratados con inhibidores de calcineurina o con inhibidores de mTOR<sup>(73)</sup>. Estos resultados los corroboran hallazgos previos en modelos animales<sup>(74)</sup>. Nuestros datos, no obstante, no demuestran si el mantenimiento de las células Tregs sanguíneas en los receptores de un injerto renal se debe a una supervivencia aumentada de las células nTregs derivadas del timo o si se han inducido en la periferia (células iTregs) como consecuencia del tratamiento con rapamicina. El efecto negativo de los inhibidores de la calcineurina puede residir en la inhibición de la producción de IL-2, citocina imprescindible para la función y homeostasis de las células Tregs<sup>(75)</sup>. Por otro lado, estos fármacos también pueden interferir en la interacción NFAT-FOXP3, inhibiendo la capacidad supresora de las células Tregs<sup>(76)</sup>.

Baan y colaboradores comprobaron que la expresión de FOXP3 se regulaba de distinta forma en el contexto de cultivos mixtos linfocitarios según el tipo de inmunosupresor que se añadía, de modo que los inhibidores de la calcineurina y los anticuerpos monoclonales anti-CD25 suprimían la expresión de FOXP3 y la capacidad reguladora de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>, mientras que la rapamicina no lo alteraba<sup>(77)</sup>. Por otro lado, ciclosporina y rapamicina no afectan a la activación de las células nTregs, pero rapamicina, y no ciclosporina, es capaz de expandir una población de células Tregs que expresan niveles elevados de CD27<sup>(78)</sup>. Esta subpoblación de células Tregs muestra una mayor capacidad supresora que las que expresan niveles normales de CD27 y, por lo tanto, el tratamiento con rapamicina es capaz de expandir esa subpoblación de células Tregs con capacidad de inhibir respuestas aloinmunitarias en marcha<sup>(78)</sup>. Más interesante aún parece la capacidad de la rapamicina no sólo de expandir aquellas células nTregs, sino que células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive se pueden diferenciar *in vitro* hacia células con fenotipo Tregs y expresión de FOXP3 mediante la estimulación a través del TCR en presencia de rapamicina<sup>(79)</sup>. Este efecto es reversible y, además, depende de la presencia en el medio de forma continua de rapamicina. De todos modos, la evidencia directa de esta conversión a célula Treg desde célula naïve no es clara puesto que la expresión de FOXP3 en células T humanas tras activación es promiscua<sup>(80)</sup>.

Como ya se ha comentado anteriormente, en el campo del trasplante la inmunidad o la tolerancia depende del balance entre células T citotóxicas y células Tregs aloespecíficas. A pesar de las evidencias que han aparecido recientemente acerca del papel beneficioso de las células Tregs en la evolución del aloinjerto, tanto en modelos animales como en humanos, sigue siendo tema de debate si esas células

Tregs, bien naturales o bien inducidas a nivel periférico, son aloespecíficas y contribuyen a la tolerancia específica del donante. En este mismo año, el grupo de Strom en Boston ha demostrado cómo el empleo de protocolos inmunosupresores inductores de tolerancia favorecen la generación de células Tregs aloespecíficas *de novo* en un modelo murino de injertos de piel empleando un ratón “knock-in” para Foxp3GFP<sup>(81)</sup>. En concreto, demuestran como el tratamiento con rapamicina promueve y sinergiza con un anticuerpo monoclonal anti-CD154, la conversión de células T CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup> alorreactivas periféricas en células Tregs FOXP3<sup>+</sup> resistentes a la apoptosis. Estas células transformadas en células Tregs tras su exposición a rapamicina son capaces de conferir protección donante-específica frente al rechazo de aloinjertos cutáneos<sup>(81)</sup>. Por el contrario, el tratamiento con ciclosporina inhibe la conversión a células Tregs. Además, el tratamiento *in vivo* con rapamicina induce una supervivencia de los aloinjertos cutáneos de más de 100 días en el 100 % de los casos de ratones a los que se ha transferido células CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup> mientras que el 100% de los injertos se pierden a los 50 días en los ratones tratados con ciclosporina<sup>(81)</sup>. La teoría del grupo de Boston es que la rapamicina es más tolerogénica que la ciclosporina porque, por un lado, favorece la muerte inducida tras la activación de las células T citotóxicas en un trasplante y, por otro, promueve la generación de células Treg donante-específicas<sup>(81-84)</sup>. Por el contrario, ciclosporina bloquea la apoptosis de las células T efectoras y no promueve la generación de células Treg<sup>(81)</sup>. Otro mecanismo adicional a favor de la supuesta capacidad tolerogénica de la rapamicina reside en su pobre capacidad estimuladora de la respuesta alógena al inhibir la maduración de las células dendríticas, junto con un mantenimiento de la maduración de las células Tregs, lo que favorece el equilibrio hacia un predominio de las células Tregs sobre las efectoras<sup>(85)</sup>. Es decir, la posible expansión de células Tregs con los inhibidores de mTOR no sólo sería consecuencia del efecto directo en las células T sino también del efecto en las células dendríticas<sup>(86,87)</sup>.

Los inhibidores de mTOR y los inhibidores de la calcineurina son los inmunosupresores más empleados en la clínica, junto con el ácido micofenólico (MMF). Así, como se ha investigado el posible efecto de los primeros en la inducción de células Tregs, prácticamente no existen evidencias del papel de MMF sobre las células Tregs. Sin embargo, la administración de MMF conjuntamente con inhibidores de mTOR parece favorecer la expansión de las células Tregs e inhibir la proliferación y expansión de las células T memoria. MMF sería el encargado de inhibir las células T memoria, tal como sugieren los resultados *in vitro* en cultivos mixtos linfocitarios<sup>(88)</sup> e *in vivo* con ratones transgénicos<sup>(89)</sup>. De forma

semejante a los inhibidores de mTOR, MMF parece favorecer la expansión de células Tregs mediante la inducción de células dendríticas tolerogénicas, prolongando la supervivencia de aloinjertos de islotes pancreáticos<sup>(90)</sup>. Parece que el efecto de MMF en las células dendríticas es mediado el receptor de la vitamina D3 que compartirían MMF y la vitamina D3<sup>(91)</sup>.

Por último, han aparecido evidencias recientes sobre el efecto favorecedor de células Tregs por los protocolos de inducción con anticuerpos monoclonales que deplecionan células T. Así, el tratamiento deplecionante con Campath-1H (anti-CD52) genera una expansión de la población de células Tregs sanguíneas en presencia de inmunosupresión con rapamicina<sup>(92)</sup>. Este efecto estaría en relación con el fenómeno conocido como proliferación homeostática en situaciones de linfopenia<sup>(93)</sup>. Así, las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> expresan el marcador de proliferación Ki-67 en trasplantados renales tras la depleción de células T con el anticuerpo Campath-1H<sup>(92)</sup> y las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> transferidas a ratones Rag1<sup>-/-</sup> proliferan pero no las CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup><sup>(93)</sup>. Otros anticuerpos empleados en los protocolos de inducción en trasplante renal, como anti-timoglobulina (ATG), parecen favorecer también la generación de células Tregs. Sin embargo, el mecanismo sería distinto al de anti-CD52 puesto que han mostrado ser capaces de inducir la conversión y expansión de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> *ex vivo*<sup>(94)</sup>. Aún no hay evidencias *in vivo*.

## CONCLUSIÓN

Junto al empleo de regímenes farmacológicos que favorezcan la inducción y mantenimiento de las células T reguladoras, actualmente se considera factible la posibilidad de usarlas para realizar inmunoterapia celular. Las ventajas de este tipo de tratamiento son evidentes: especificidad antigénica, efecto duradero de la regulación *in vivo* y el diseño individualizado al paciente. Pero las dudas y preguntas sin resolver son aún excesivas, incluyendo el tipo de célula T reguladora más útil; los métodos de generación y expansión más fiables, útiles y seguros; y las patologías o procesos donde pueda tener mayor aplicación esta inmunoterapia. En este sentido, el trasplante de órganos se postula como una posible aplicación, tal como se ha comentado en esta revisión.

Respondiendo a todas las cuestiones pendientes probablemente se puedan aislar y expandir las células T con una capacidad supresora aumentada, que permitan reducir el grado de inmunosupresión y sus efectos nocivos a largo plazo por un estado de tolerancia que prolongue la supervivencia del aloinjerto y del receptor. Si no, al menos



es posible que podamos identificar aquellos receptores de un trasplante con un mayor número y/o función de células Tregs, indicadoras de un estado de tolerancia más efectiva y que precisen una menor dosis de inmunosupresión farmacológica.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por ayudas del Ministerio de Sanidad y Consumo (PI050047), Fundación Marqués de Valdecilla (API 07/12) y Fundación Mutua Madrileña (ACI 07/01).

## CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

### CORRESPONDENCIA:

Dr. Nicole Thielens  
Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire  
Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel  
41 rue Jules Horowitz  
38027 Grenoble Cedex 1 (France)  
Phone number: 33 4 38 78 95 79. Fax: 33 4 38 78 54 94  
E-mail: nicole.thielens@ibs.fr

## BIBLIOGRAFÍA

- Sayegh MH, Carpenter CB. Transplantation 50 years later: progress, challenges, and promises. *N Engl J Med* 2004; 351: 2761-2766.
- Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2005; 351: 2715-2729.
- Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant* 2004; 4: 378-383.
- Meier-Kriesche HU, Schold JD, Kaplan B. Long-term renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant* 2004; 4: 1289-1295.
- Quantz MA, Novick RJ. Outcomes following cardiac transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2000; 5: 158-164.
- Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003; 349: 2326-2333.
- Colvin RB. Chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003; 349: 2288-2290.
- Joosten SA, Sijpkens WJ, Van Kooten C, Paul LC. Chronic renal allograft rejection: pathophysiologic considerations. *Kidney Int* 2005; 68: 1-13.
- Chapman JR, O'Connell PJ, Nankivell BJ. Chronic renal allograft dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 3015-3026.
- Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, et al. Banff'05 meeting report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007; 7: 518-526.
- Wong W, Venetz J-P, Tolfokk-Rubin N, Pascual M. 2005 immunosuppressive strategies in kidney transplantation: which role for the calcineurin inhibitors? *Transplantation* 2005; 80: 289-296.
- Rogers NJ, Lechler RI. Alloreognition. *Am J Transplant* 2001; 1: 97-102.
- Magee CC, Pascual M. Update in renal transplantation. *Arch Intern Med* 2004; 164: 1373-1388.
- Newell KA, Larsen CP. Tolerance assays: measuring the unknown. *Transplantation* 2006; 81: 1503-1509.
- Najafian N, Albin MJ, Newell KA. How can we measure immunologic tolerance in humans? *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2652-2663.
- van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: shutting lymphocytes off. *Science* 1998; 280: 243-248.
- Healy JL, Goodnow CC. Positive versus negative signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 645-670.
- Kilshaw P, Brent L, Pinto M. Suppressor T cells in mice made unresponsive to skin allografts. *Nature* 1975; 255: 489-491.
- Dorf M, Kuchroo VK, Collins M. Suppressor T cells: some answers but more questions. *Immunol Today* 1992; 13: 241-243.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151-1164.
- Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *J Exp Med* 2001; 193: 1311-1317.
- Gregori S, Casorati M, Amuchastegui S, Smirardo S, Davalli AM, Adorini L. Regulatory T cells induced by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J Immunol* 2001; 167: 1945-1953.
- Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* 2003; 171: 6323-6327.
- Jiang H, Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest* 2004; 114: 1198-1208.
- Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 2006; 25: 195-201.
- Liu Z, Tugulea S, Cortesini R, Suciuc-Foca N. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> T cells. *Int Immunol* 1998; 10: 775-783.
- Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, Piazza F, et al. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol* 2002; 3: 237-243.

28. Manavalan JS, Kim-Schulze S, Scotto L, Naiyer AJ, Vlad G, Colombo PC, et al. Alloantigen specific CD8<sup>+</sup>CD28-FOXP3<sup>+</sup> T suppressor cells induce ILT3<sup>+</sup> ILT4<sup>+</sup> tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *Int Immunol* 2004; 16: 1055-1068.
29. Sonoda KH, Stein-Streilein J. CD1d on antigen-transporting APC and splenic marginal zone B cells promotes NKT cell-dependent tolerance. *Eur J Immunol* 2002; 32: 848-857.
30. Falcone M, Facciotti F, Ghidoli N, Monti P, Olivieri S, Zaccagnino L, et al. Up-regulation of CD1d expression restores the immunoregulatory function of NKT cells and prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 2004; 172: 5908-5916.
31. Kronenberg M. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 877-900.
32. Jiang X, Kojo S, Harada M, Ohkohchi N, Taniguchi M, Seino K-I. Mechanism of NKT cell-mediated transplant tolerance. *Am J Transplant* 2007; 7: 1482-1490.
33. Fehervari Z, Sakaguchi S. CD4<sup>+</sup> Tregs and immune control. *J Clin Invest* 2004; 114: 1209-1217.
34. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6: 345-352.
35. Huehn J, Siegmund K, Lehmann JC, Siewert C, Haubold U, Feuerer M, et al. Developmental stage, phenotype, and migration distinguishes naive- and effector/memory-like CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Exp Med* 2004; 199: 303-313.
36. Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 2005; 6: 331-337.
37. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 2001; 27: 18-20.
38. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001; 27: 20-21.
39. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepers B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001; 27: 68-73.
40. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, et al. Thymic selection of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2002; 3: 756-763.
41. Khattni R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 337-342.
42. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299: 1057-1061.
43. Wang YY, Flavell RA. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 2007; 445: 766-770.
44. Long E, Wood KJ. Understanding FOXP3: progress toward achieving transplantation tolerance. *Transplantation* 2007; 84: 459-461.
45. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, et al. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 2007; 445: 771-775.
46. Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, DeRoos P, Ho WY, Stray-Pedersen A, 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.
47. Vukmanovic-Stejić M, Zhang Y, Cook JE, Fletcher JM, McQuaid A, Masters JE, et al. Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *J Clin Invest* 2006; 116: 2829-2830.
48. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> T reg cells. *J Exp Med* 2006; 203: 1701-1711.
49. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 2006; 212: 28-50.
50. Roncarolo MG, Battaglia M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self-antigens and alloantigens in humans. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 585-598.
51. MacDonald TT. T cell immunity to oral allergens. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 620-627.
52. Liu VC, Wong LY, Jang T, Shah AH, Park I, Yang X, et al. Tumor evasion of the immune system by converting CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells into CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J Immunol* 2007; 178: 2883-2892.
53. Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner HL. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *J Immunol* 2007; 178: 179-185.
54. Lechler RI, Garden AO, Turka LA. The complementary roles of deletion and regulation in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 147-158.
55. Jiang S, Tsang J, Game DS, Stevenson S, Lombardi G, Lechler RI. Generation and expansion of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells with indirect allospecificity: potential reagents to promote donor-specific transplantation tolerance. *Transplantation* 2006; 82: 1738-1743.
56. Sanchez-Fueyo A, Domenig CM, Mariat C, Alexopoulos SI, Zheng XX, Strom TB. Influence of direct and indirect allorecognition pathways on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell function in transplantation. *Transplant Int* 2007; 20: 534-541.
57. Niimi M, Shirasugi N, Ikeda Y, Wood KJ. Oral antigen induces allograft survival by linked suppression via the indirect pathway. *Transplant Proc* 2001; 33: 81.
58. Lagaaij EL, Hennemann IP, Ruigrok M, de Haan MW, Persijn GG, Termijtelen A, et al. Effect of one-HLA-DR antigen-matched and completely HLA-DR-mismatched blood transfusions on survival of heart and kidney allografts. *N Engl J Med* 1989; 321: 701-705.

59. Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Snopkowski C, Naqvi R, Lee JB, et al. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Eng J Med* 2005; 353: 2342-2351.
60. Veronese F, Rotman S, Smith RN, Pelle TD, Farrell ML, Kawai T, et al. Pathological and clinical correlates of FOXP3<sup>+</sup> cells in renal allografts during acute rejection. *Am J Transplant* 2007; 7: 914-922.
61. San Segundo D, Fernández-Fresnedo G, Rodrigo E, Ruiz JC, Lopez-Hoyos M, Arias M. Monitoring of regulatory T cell subpopulations in renal transplant patients during the first year posttransplantation: influence of immunosuppression. *Transplant Proc* (en prensa).
62. Lin CY, Graca L, Cobbold SP, Waldmann H. Dominant transplantation tolerance impairs CD8<sup>+</sup> T cell function but not expansion. *Nat Immunol* 2002; 3: 1208-1213.
63. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 199-210.
64. Golshayan D, Buhler L, Lechler RI, Pascual M. From current immunosuppressive strategies to clinical tolerance of allografts. *Transplant Int* 2007; 20: 12-24.
65. Demirkiran A, Kok A, Kwekkeboom J, Kusters JG, Metselaar HJ, Tilanus HW, et al. Low circulating regulatory T-cell levels after acute rejection in liver transplantation. *Liver Transplant* 2006; 12: 277-284.
66. Meloni F, Vitulo P, Bianco AM, Paschetto E, Morosini M, Cascina A, et al. Regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in the peripheral blood of lung transplant recipients: correlation with transplant outcome. *Transplantation* 2004; 77: 762-766.
67. Miura Y, Thoburn CJ, Bright EC, Phelps ML, Shin T, Matsui EC, et al. Association of Foxp3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease. *Blood* 2004; 104: 2187-2193.
68. Rezvani K, Mielke S, Ahmadzadeh M, Kilical Y, Savani BN, Zeilah J, et al. High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Blood* 2006; 108: 1291-1297.
69. Clark FJ, Gregg R, Piper K, Dunnion D, Freeman L, Griffiths M, et al. Chronic graft-versus-host disease is associated with increased numbers of peripheral blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells. *Blood* 2004; 103: 2410-2416.
70. Roncarolo MG, Battaglia M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 585-598.
71. Newell KA, Larsen CP, Kirk AD. Transplant tolerance: converging on a moving target. *Transplantation* 2006; 81: 1-6.
72. Battaglia M, Stablini A, Roncarolo MG. Rapamycin selectively expands CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Blood* 2005; 105: 4743-4748.
73. San Segundo D, Ruiz JC, Izquierdo M, Fernández-Fresnedo G, Gomez-Alamillo, Merino R, et al. Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in renal transplant recipients. *Transplantation* 2006; 82: 550-557.
74. Zheng XX, Sanchez-Fueyo A, Sho M, Domenig C, Sayegh MH, Strom TB. Favorably tipping the balance between cytopathic and regulatory T cells to create transplantation tolerance. *Immunity* 2003; 19: 503-514.
75. Furtado GC, Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. Interleukin 2 signaling is required for CD4<sup>+</sup> regulatory T cell function. *J Exp Med* 2002; 196: 851-857.
76. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 2006; 126: 375-387.
77. Baan CC, van der Mast BJ, Klepper M, Mol WM, Peeters AM, Korevaar SS, et al. Differential effect of calcineurin inhibitors, anti-CD25 antibodies and rapamycin on the induction of FOXP3 in human T cells. *Transplantation* 2005; 80: 110-117.
78. Coenen JA, Koenen HJPM, Van Rijssen E, Hilbrands LB, Joosten I. Rapamycin, and not cyclosporin A, preserves the highly suppressive CD27<sup>+</sup> subset of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Blood* 2006; 107: 1018-1023.
79. Valmori D, Tosello V, Souleimanian NE, Godefroy E, Scotto L, Wang Y, et al. Rapamycin-mediated enrichment of T cells with regulatory activity in stimulated CD4<sup>+</sup> T cell cultures is not due to the selective expansion of naturally occurring regulatory T cells but to the induction of regulatory functions in conventional CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 2006; 177: 944-949.
80. Walker MR, Kasprowicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *J Clin Invest* 2003; 112: 1437-1443.
81. Gao W, Lu Y, El Essawy B, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB. Contrasting effects of cyclosporine and rapamycin in de novo generation of alloantigen-specific regulatory T cells. *Am J Transplant* 2007; 7: 1722-1732.
82. Wells AD, Li XC, Li Y, Walsh MC, Zheng XX, Wu Z, et al. Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance. *Nat Med* 1999; 5: 1303-1307.
83. Li Y, Zheng XX, Li XC, Zand MS, Strom TB. Combined costimulation blockade plus rapamycin but not cyclosporine produces permanent engraftment. *Transplantation* 1998; 66: 1387-1388.
84. Li Y, Li XC, Zheng XX, Wells AD, Turka LA, Strom TB. 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.
85. Turnquist HR, Raimondi G, Zahorchak AF, Fischer RT, Wang Z, Thomson AW. Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4<sup>+</sup> T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells and promote organ transplant tolerance. *J Immunol* 2007; 178: 7018-7031.
86. Hackstein H, Taner T, Zahorchak AF, Morelli AE, Logar AJ, Gessner A, et al. Rapamycin inhibits IL-4-induced dendritic cell maturation in vitro and dendritic cell mobilization and function in vivo. *Blood* 2003; 101: 4457-4463.
87. Taner T, Hackstein H, Wang Z, Morelli AE, Thomson AW. Rapamycin-treated, alloantigen-pulsed host dendritic cells induce ag-specific T cell regulation and prolong graft survival. *Am J Transplant* 2005; 5: 228-236.

88. Trzonkowski P, Zilvetti M, Friend P, Wood KJ. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of CTL and NK cells in humans-impact of immunosenescence. *Clin Immunol* 2006; 119: 307-316.
89. Quemeneur L, Beloeil L, Michallet MC, Angelov G, Tomkowiak M, Revillard JP, et al. Restriction of de novo nucleotide biosynthesis interferes with clonal expansion and differentiation into effector and memory CD8 T cells. *J Immunol* 2004; 173: 4945-4952.
90. Gregori S, Casorati M, Amuchastegui S, Smioldo S, Davalli AM, Adorini L. Regulatory T cells induced by 1  $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J Immunol* 2001; 167: 1945-1953.
91. Adorini L, Penna G, Giarratana N, Uskokovic M. Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting allograft rejection and autoimmune diseases. *J Cell Biochem* 2003; 88: 227-233.
92. Noris M, Casiraghi F, Todeschini M, Cravedi P, Cugini D, Monteferrante G, et al. Regulatory T cells and T cell depletion: role of immunosuppressive drugs. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 1007-1018.
93. Zhang H, Chua KS, Guimond M, Kapoor V, Brown MV, Fleisher TA. Lymphopenia and interleukin-2 therapy alter homeostasis of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Med* 2005; 11: 1238-1243.
94. Lopez M, Clarkson MR, Albin M, Sayegh MH, Najafian N. A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2844-2853.