



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Facultad de Medicina

Dpto. de Biología Molecular

**“MONITORIZACIÓN DE LAS CÉLULAS T
REGULADORAS CIRCULANTES EN TRASPLANTE
RENAL HUMANO E INFLUENCIA DE LA
INMUNOSUPRESIÓN FARMACOLÓGICA”**

Tesis doctoral presentada por David San Segundo Arribas para
optar al Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Santander, 2010

Facultad de Medicina

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

D. **MARCOS LÓPEZ HOYOS**, Doctor en Medicina y Cirugía y Facultativo Especialista de Área de Inmunología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla

CERTIFICA QUE, el trabajo de investigación titulado “**Monitorización de las células T reguladoras circulantes en trasplante renal humano e influencia de la inmunosupresión farmacológica**” presentado por D. **DAVID SAN SEGUNDO ARRIBAS** para optar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria y en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla bajo mi dirección.

Examinado el trabajo considero que está adecuadamente elaborado para su lectura y defensa pública y ante la Comisión que ha de juzgar la Tesis Doctoral.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expido este certificado en Santander a 3 de marzo de 2010.



Dr. Jesús Merino Pérez
Profesor Titular de Inmunología
Dpto Biología Molecular (Facultad de
Medicina)
Tf: 942 201956 Fax 942 201945
e-mail merinoj@unican.es

Por la presente hago constar que desde el curso académico 2004-2005 he actuado como Tutor de D. David San Segundo Arribas, Licenciado en CC Biológicas, en el Programa de Doctorado de Biomedicina.

Así mismo, he seguido muy de cerca el desarrollo de su proyecto de Tesis Doctoral sobre "Monitorización de las células T reguladoras circulantes en trasplante renal humano e influencia de la inmunosupresión farmacológica" dirigido por el Dr Marcos López Hoyos, Facultativo Especialista del Area de Inmunología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla de Santander.

El trabajo ha sido llevado a cabo con rigor y calidad científica, avalados por varias publicaciones en revistas de prestigio, alguna de las cuales ya tiene un elevado número de citaciones en la literatura, motivos por los cuales avalo la presentación como Tesis Doctoral de la presente memoria.

En Santander a 3 de marzo de 2010

A mi familia

Agradecimientos

Para no olvidarme de nadie, me gustaría agradecer a todas aquellas personas que se alegren de la consecución de este trabajo. Por todo su apoyo, pueden sentirse responsables y partícipes del mismo.

En particular, me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento al Dr Marcos López Hoyos, que ha confiado en mí desde el principio y me ha ofrecido su apoyo incondicional durante todas las etapas de las que ha constado la elaboración de esta Tesis. Gracias por tu perseverancia y rigor a la hora de dirigir el trabajo.

A los Dres Jesús y Ramón Merino por abrirme la puerta de la Universidad de Cantabria y hacerme sentir como en casa en su laboratorio, además de estar siempre dispuestos a resolver cualquier duda.

Al Dr Manuel Arias como Jefe del Servicio de Nefrología por permitirme trabajar en su grupo de investigación, sus razonamientos críticos y ganas de cooperar en todo momento.

A la Dra Gema Fernández Fresnedo por su trabajo incondicional con el reclutamiento de pacientes así como la recogida de datos clínicos, eficacia y amabilidad, todo un ejemplo de trabajo en grupo.

A todo el personal del Servicio de Inmunología que han sufrido los “efectos colaterales” de este trabajo, desde el magnífico grupo de Residentes que me acogieron en el año 2003, Luis, Juan, Carlos, Herminio, Alfredo y mi compañera Alexandra, a todos gracias por darme otra visión de la inmunología, pasando por todas las categorías, enfermeras, técnicos y auxiliares, por su paciencia y por crear un fantástico ambiente de trabajo y tener siempre una palabra de aliento y apoyo en los momentos difíciles.

A todos los becarios que han pasado por el laboratorio y con los que he compartido horas de risas y lágrimas entre las “campanas” y el citómetro. Me gustaría tener un recuerdo especial con Iñaki y Lorena, trabajadores incansables y sobre todo, amigos.

No quisiera olvidarme de Marta por su generosa ayuda con el “sorter”, sin duda, pieza clave en el trabajo, mucha suerte y ánimo.

A todos los Facultativos del Servicio de Nefrología que gracias a su coordinación han hecho posible la recogida de todas las muestras en sus consultas, a las enfermeras de la planta de Nefrología y sobre todo, a los pacientes que, de manera altruista, han accedido a formar parte de este proyecto.

Por último y más importante, a toda mi familia, a mis padres por tener siempre las palabras exactas en cada momento de apoyo y cariño, gracias por ser como sois. A mi

hermano Raúl, por su inestimable ayuda con la estadística y ser el mejor amigo que podía tener.

Al resto de familiares y amigos que siempre me han preguntado por mi trabajo. Y por supuesto a Cristina, fuente de mi inspiración.

Si me olvido de alguien, pido perdón.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

A

AcMo:	Anticuerpos monoclonales
APC:	Alofococianina
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
ATP:	Adenosín trifosfato

C

CCR:	Receptor de quimiocinas
CNI:	Inhibidor de la calcineurina
CPA:	Célula presentadora de antígeno
Cr:	Creatinina
CsA:	Ciclosporina
CTLA:	Antígeno linfocitario T citotóxico

D

D:	Donantes sanos
DCs:	Células dendríticas
DMSO:	Dimetil sulfóxido
DN:	Doble negativas
DSC:	Esplenocitos del donante

E

EAE:	Enfermedad autoinmune experimental
EDTA:	Etilen diamino-tetraacético
ELISA:	Enzimo-inmunoensayo
ERT:	Enfermedad renal terminal

F

FBS:	Suero fetal bobino
FG:	Filtración glomerular
FITC:	Isocianato de fluoresceína
Foxp3:	Represor transcripcional de la familia forkhead/winged-helix 3

G

GITR:	Gen relacionado con el factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides
GVHD:	Enfermedad injerto contra huésped

H

HLA:	Antígeno Leucocitario Humano
HRP:	Peroxidasa de rábano picante
HUMV:	Hospital Universitario Marqués de Valdecilla

I

ICAM:	Molécula de adherencia intracelular
IDO:	Indolamina 2,3 dioxigenasa
IFN:	Interferón
IL:	Interleucina
ILT:	Transcriptos tipo inmunoglobulina
imTOR:	Inhibidor de mTOR
IPEX:	Inmunodisregulación, poliendocrinopatía, enteropatía ligada al cromosoma X
iTreg:	Célula T reguladora inducida

L

LAG:	Gen de activación de linfocitos
LFA:	Antígeno asociado a la función del linfocito

M

MBP:	Proteína de unión a mielina
MDRD:	Modificación de la dieta en enfermedad renal
MHC:	Molécula de histocompatibilidad
MMF:	Ácido mofetil micofenolato
mTOR:	Mamalian target of Rapamycin, diana de la Rapamicina

N

NCT:	Nefropatía crónica del trasplante
NK:	Natural killer
NKT:	célula T natural killer
NKκB:	Factor nuclear κB
NTA:	Necrosis tubular aguda
nTreg:	células T reguladoras naturales

P

PBMCs:	Células mononucleares de sangre
PBS:	Tampón fosfato salino
PE:	Ficoeritrina
PerCP:	Proteína clorofila-a peridina

R

RA:	Rechazo Agudo
Rapa:	Rapamicina
RPMI:	Medio Roswell Park Memorial Institute

T

Tac:	Tacrolimus
TCR:	Receptor de células T
TGF:	Factor de crecimiento transformante
TG:	Timoglobulina
T_H1:	Células T colaboradoras tipo 1
T_H17:	Células T colaboradoras tipo 17
T_H2:	Células T colaboradoras tipo 2
T_H3:	Células T colaboradoras tipo 3
TLR:	Receptores tipo Toll
TMB:	Tetrametil benzidina
TNF:	Factor de necrosis tumoral
Tr1:	Células reguladoras tipo 1
Tregs:	Células T reguladoras
Trp:	Triptófano
α-GalCer:	α -Galactosil-ceramida
ΔFG:	Incremento de la filtración glomerular

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Trasplante renal. Antecedentes	1
1.2. Problemática actual del trasplante renal	4
1.3. Inmunosupresión	5
1.4. Mecanismos de tolerancia a aloantígenos.....	6
1.5. Células T reguladoras	8
1.5.1. Perspectiva histórica	8
1.5.2. Células T CD4 ⁺ reguladoras	9
1.5.2.1. Células T CD4 ⁺ reguladoras naturales.....	11
1.5.2.2. Células T CD4 ⁺ reguladoras inducidas.....	14
1.5.2.2.1. Células Tr1	14
1.5.2.2.2. Células T _H 3.....	18
1.5.3. Células T CD8 ⁺ reguladoras	20
1.5.4. Células NKT.....	22
1.5.5. Células T reguladoras doble negativas	24
1.6. Células T reguladoras en trasplante	25
1.6.1. Células T reguladoras naturales en trasplante.....	25
1.6.2. Células T reguladoras inducidas en trasplante.....	30
1.6.2.1. Células Tr1 en trasplante	30
1.6.2.2. Células T _H 3 en trasplante	31
1.6.3. Células T CD8 ⁺ reguladoras en trasplante	31
1.6.4. Células NKT en trasplante.....	32
1.6.5. Células T reguladoras doble negativas en trasplante	34
2. HIPÓTESIS	37
3. OBJETIVOS	41
4. MATERIAL Y MÉTODOS	43
4.1. Pacientes.....	43
4.1.1. Estudio prospectivo	43
4.1.2. Estudio retrospectivo	44
4.1.3. Datos clínicos	45
4.2. Muestras sanguíneas.....	46
4.2.1. Muestras del receptor	46
4.2.2. Muestras del donante.....	47
4.3. Citometría.....	48
4.3.1. Marcaje superficial	48
4.3.2. Marcaje intracelular.....	48
4.4. Clasificación celular (Sorting).....	50

4.5. Cultivos mixtos linfocitarios.....	50
4.6. Enzimo-inmunoensayos (ELISA).....	53
4.6.1. ELISA para la determinación de IL-17 en suero	53
4.6.2. ELISA para la determinación de IL-23 en suero	54
4.6.3. ELISA para la determinación sérica de CD30 soluble	55
4.7. Análisis estadístico	56
5. RESULTADOS	57
5.1. Bloque I: Estudio Prospectivo	57
5.1.1. Análisis de los números absolutos de subpoblaciones linfocitarias en pacientes trasplantados renales.....	57
5.1.2. Comparación de las subpoblaciones linfocitarias en pacientes trasplantados renales en función de diversas situaciones clínicas	61
5.1.2.1. Retrasplante	62
5.1.2.2. Necrosis tubular aguda	63
5.1.2.3. Rechazo agudo.....	66
5.1.3. Comparación de las subpoblaciones linfocitarias en pacientes trasplantados renales según la función del injerto	68
5.1.4. Comparación de las subpoblaciones linfocitarias en pacientes trasplantados renales según el régimen inmunosupresor	70
5.1.4.1. Tratamiento de inducción	71
5.1.4.2. Efecto del tratamiento de mantenimiento sobre las subpoblaciones linfocitarias	72
5.1.4.2.1. Efecto del tratamiento de mantenimiento sobre las subpoblaciones linfocitarias con fenotipo regulador. Influencia de la carga inmunosupresora	74
5.2. Bloque II: Estudio Retrospectivo.....	80
5.2.1. Frecuencia y caracterización de las células reguladoras en receptores de aloinjerto renal: diferencia entre los pacientes tratados con Rapa y CNI	81
5.2.2. Función reguladora de las células T CD4 ⁺ reguladoras en reacción mixta linfocitaria	84
5.2.3. Relación entre frecuencias de células T reguladoras en pacientes tratados con CNI o Rapa y función renal	85
6. DISCUSIÓN	87
7. CONCLUSIONES	97
8. BIBLIOGRAFÍA	99
9. ANEXOS	115
9.1. Anexo I: Tablas de resultados.....	115
9.2. Anexo II: Publicaciones derivadas de la tesis.....	128
9.3. Anexo III: Otras publicaciones	174

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Trasplante renal. Antecedentes.

En las últimas décadas la principal opción terapéutica en los pacientes con insuficiencia renal crónica es el trasplante renal. En España la primera intervención se realizó en el año 1965 en el Hospital Clinic i Provincial de Barcelona. En los últimos años en nuestro país se han realizado el 7-9% de los trasplantes renales de todo el mundo. Desde el primer trasplante renal, el número de intervenciones en España ha ido aumentando progresivamente (Figura 1).

Gracias al incremento en la realización de trasplantes renales se está consiguiendo estabilizar las listas de espera de los pacientes con insuficiencia renal crónica. A pesar de estos resultados alentadores, los pacientes trasplantados necesitan estar sometidos a un régimen inmunosupresor inespecífico para evitar el rechazo del injerto. Con este estado de inmunosupresión inducido, los pacientes trasplantados están expuestos a infecciones oportunistas y al desarrollo de neoplasias a largo plazo. Por este motivo, uno de los objetivos en el campo del trasplante es obtener una inmunosupresión específica para evitar desórdenes generalizados sobre el sistema inmunitario.

Para intentar minimizar el efecto de la alorespuesta inmunitaria en el rechazo del órgano, se realiza el fenotipaje de donantes y receptores, lo que asegura una mejor identidad de los antígenos leucocitarios humanos (HLA) y se detectan los niveles de anticuerpos preformados anti-donante, para evitar el rechazo hiperagudo. A pesar de la incorporación de estas pruebas para el cribado de los pacientes candidatos al trasplante, el rechazo agudo (RA) ha sido uno de los principales problemas hasta hace muy pocos años. En los años 80 hasta un 60% de los pacientes sufría algún episodio de RA [1]. En la segunda mitad de la década de los noventa, con la incorporación de nuevos fármacos

inmunosupresores, la cifra de pacientes trasplantados que presentaron un episodio de RA se redujo hasta un 23% [2].

Trasplantes renales realizados en España (Fuente ONT)

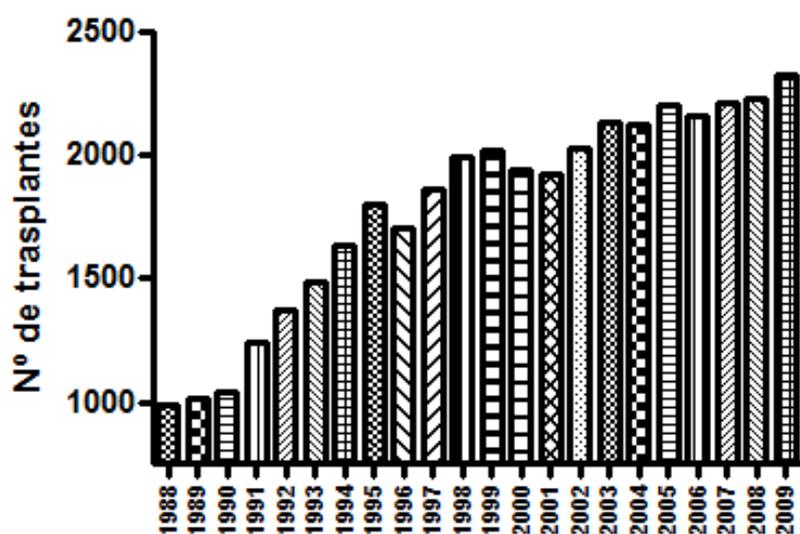


Figura 1. Evolución del número de trasplantes renales realizados en España desde el año 1988.

El RA se puede definir como un deterioro agudo en la función del injerto asociado a cambios patológicos específicos en dicho injerto. Esta patología es confirmada mediante biopsia del órgano trasplantado y se puede diferenciar, en función de la etiología, en celular o humoral. En el RA celular se observa una infiltración intersticial de células mononucleares, incluso ocasionalmente eosinófilos, y una lesión en la membrana basal tubular (tubulitis) provocada por dicha infiltración. Sin embargo, el RA humoral o mediado por anticuerpos, está caracterizado patológicamente por edema endotelial capilar, necrosis fibrinoide arteriolar y trombo fibrinoide en los capilares glomerulares.

En general, en el rechazo agudo, tanto humoral como celular, se objetiva vasculitis y glomerulonefritis con neutrófilos en capilares glomerulares y peritubulares. En realidad, esta diferenciación es más didáctica que real ya que en algún caso se puede observar ambos tipos de RA. Durante los últimos años uno de los objetivos en el campo del trasplante ha sido la creación de guías para la estandarización de los criterios de rechazo. Por esto, en la década de los noventa se diseñó la clasificación de Banff [3], que en el año 2007 ha sido revisada y modificada en alguna de sus categorías [4].

Aunque el tratamiento del RA es satisfactorio en la mayoría de los casos, recuperando la función del injerto renal, se ha demostrado una mayor incidencia de rechazo crónico en los pacientes que han sufrido previamente un RA [5]. Por esta razón, varios grupos de investigación se han interesado en buscar una serie de marcadores de RA. Los grupos de Strom y Suthanthiran en los años 90 observaron como la sobreexpresión de los genes granzima y perforina en las células mononucleares de sangre [6] y en células urinarias [7] de los pacientes trasplantados renales detectaba fidedignamente el RA. Asimismo, otros grupos han observado un incremento en el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de estos y otros genes implicados en la respuesta citotóxica en biopsias de pacientes trasplantados renales con RA [8].

Actualmente, en la mayoría de las series estudiadas se consiguen tasas de RA por debajo del 15% (incluso por debajo del 10%) en el primer año post trasplante, debido en parte, a la utilización de diferentes regímenes inmunosupresores [9].

Con estos resultados positivos a corto plazo, todos los esfuerzos se dirigen ahora hacia la búsqueda de marcadores que puedan predecir el daño del injerto a largo plazo.

1.2. Problemática actual del trasplante renal

Una vez superados los problemas a corto plazo, el principal problema al que se enfrentan los pacientes trasplantados renales es la supervivencia del injerto a largo plazo. Aunque la supervivencia de los órganos trasplantados es, en un principio, muy alta (alcanzando el 85%-95% al primer año), a los 10 años se produce un número considerable de fracasos de órganos funcionantes que puede llegar a representar una pérdida anual del 5% de todos los injertos [10]. Al contrario que en el RA, en donde la implicación de células pertenecientes al sistema inmunitario es indudable, en el rechazo del injerto renal a largo plazo, se han descrito diversos factores implicados, tanto inmunológicos como no inmunológicos. Entre estos últimos destacan los factores peritrasplante [estrategia quirúrgica, tiempo de isquemia fría, daño durante la preservación del órgano, daño isquémico y necrosis tubular aguda (NTA) que provoca un retraso en la función del injerto], factores del propio receptor (edad, diabetes, hipertensión, hiperlipidemia, sensibilización previa), factores del donante (utilización de donantes subóptimos, daño en muerte cerebral), factores farmacológicos (nefrotoxicidad de anticalcineurínicos) así como la aparición previa de algún episodio de RA [11]. Se ha demostrado que todos estos factores participan en mayor o menor medida en el desarrollo de la nefropatía crónica del trasplante (NCT) [5], siendo en la mayoría de los registros la causa más frecuente de la pérdida del injerto a largo plazo, junto con la muerte del paciente con injerto funcional [12].

La NCT es una patología caracterizada por una disfunción renal progresiva acompañada de fibrosis intersticial crónica, atrofia tubular, cambios oclusivos vasculares y glomeruloesclerosis [13]. La tendencia actual es hacia desechar el término de NCT por uno más morfológico. De hecho, la última conferencia de Banff estableció el término histológico de fibrosis intersticial y atrofia tubular para sustituir al de NCT [4].

1.3. Inmunosupresión

El éxito actual del trasplante de órganos se debe atribuir en gran parte al avance experimentado en la terapia inmunosupresora, gracias a la cual, se ha conseguido reducir el número de episodios de rechazo agudo. La variedad de fármacos inmunosupresores ha ido en aumento en los últimos años, con el consiguiente aumento en las opciones terapéuticas cuyo fin último es atenuar la respuesta inmunitaria hasta el nivel necesario para conseguir una acomodación más o menos duradera del injerto. Todos estos fármacos inmunosupresores actúan a distintos niveles de la respuesta inmunológica frente al injerto, pero lo hacen también frente a cualquier agresión que previamente era detectada y eliminada. Todos provocan una inmunodepresión no específica en menor o mayor grado, y cada uno de ellos posee diferentes efectos secundarios (Tabla 1).

A pesar de ser necesarios para alcanzar un estado de tolerancia relativa y no permanente al injerto, algunos inmunosupresores tienen efectos nocivos para el propio injerto a largo plazo, como el caso de la ciclosporina (CsA), cuya nefrotoxicidad se debe en parte a la severa vasoconstricción de la arteriola aferente, con la consiguiente reducción del flujo sanguíneo renal y filtración glomerular [14]. No obstante, estos cambios son reversibles si la administración del fármaco es discontinua. Sin embargo, a largo plazo, CsA y tacrolimus (Tac), otro inhibidor de calcineurina (CNI), producen cambios crónicos no reversibles caracterizados por fibrosis intersticial y cambios arteriolares obliterantes debido al engrosamiento de la íntima fibrosa [15]. Esta disfunción crónica del injerto obliga al paciente a volver a un programa de diálisis a la espera de un nuevo trasplante. Por lo tanto, actualmente todos los esfuerzos están dirigidos hacia el diagnóstico y detección precoz de la nefropatía crónica.

Tabla 1. Potencia y efectos secundarios de los fármacos inmunosupresores.

	CsA	Tac	Sirolimus	Aza	MMF	Corticosteroides
Potencia Inmunosupresora	+++	+++/++++	++/+++	+	++	+
Nefrotoxicidad	++	++	-/+	-	-	-
Neurotoxicidad	+	++	-	-	-	-
Hirsutismo/Hipertriosis	++	-	-	-	-	++
Rash cutáneo	-	-	+	-	-	-
Diabetogénico	+	++	-	-	-	++
Diarrea	-	-	+	-	++	-
Hepatotoxicidad	-/+	-/+	+	+	-	-
Mielotoxicidad	-	-	+	+	+	-

CsA (ciclosporina), Tac (tacrolimus), Aza (azatioprina), MMF (ácido mofetil micofenolato)
Se ha utilizado la escala gradual desde + (baja) hasta ++++ (muy elevada) [16]

1.4. Mecanismos de tolerancia a aloantígenos

Uno de los principales objetivos en el campo de trasplante es la disminución o incluso retirada de los fármacos inmunosupresores sin ningún riesgo o evidencia de pérdida del injerto. En el campo de trasplante de órganos sólidos, es en el trasplante hepático donde se ha descrito un mayor número de casos de tolerancia con retirada total de inmunosupresión [17]. Es lo que se denomina tolerancia operacional, puesto que no se trata de una verdadera tolerancia inmunitaria. Actualmente están en marcha diversas redes de investigación, una americana (ITN: Immune Tolerance Network) y otra europea (RISET: Reprogramming the Immune System for Establishment of Tolerance) en la que están involucrados diferentes grupos, con el objetivo de investigar posibles biomarcadores asociados o que sirvan para predecir el estado de tolerancia. En este contexto se están realizando estudios de expresión génica así como de inmunofenotipado de células mononucleares de sangre (PBMCs) en pacientes tolerantes al trasplante tras abandono de la inmunosupresión, con el fin de definir un perfil de tolerancia.

La evolución de la tolerancia a aloantígenos del donante *in vivo* es un proceso dinámico en el que están implicados diversos mecanismos que contribuyen en diferentes estadios [18]. La persistencia de aloantígenos se cree que es esencial para la mayoría de

los mecanismos que se han publicado. En ausencia de aloantígenos, la tolerancia se pierde inmediatamente o de forma gradual, dependiendo del mecanismo que domine en el estado de tolerancia [19]. En el campo del trasplante se puede hablar de cinco mecanismos de tolerancia: la eliminación de células T reactivas frente a aloantígenos del donante, la anergia, el agotamiento clonal, la ignorancia y la inmunorregulación. La eliminación de células T reactivas frente a aloantígenos del donante se puede alcanzar a nivel central, en timo y médula ósea, o en la periferia. En modelos animales se ha demostrado que la infusión de médula ósea del donante en un receptor previamente condicionado con tratamiento de irradiación no mieloablativo y/o inmunoterapia, activa las células presentadoras de antígenos (CPA) del donante que acceden al timo y estimulan la eliminación de los timocitos que están madurando [20]. En la periferia, la eliminación puede ser estimulada por el reconocimiento del aloantígeno bajo condiciones subóptimas, por ejemplo, bloqueo de la coestimulación [21]. El mecanismo de anergia consiste en una inactivación funcional de la respuesta de las células T frente a la reestimulación del aloantígeno. Este mecanismo se ha descrito tanto *in vivo* como *in vitro*. Algunas formas de anergia de células T conllevan un desarrollo de actividad reguladora debida a la competencia con las células T aloreactivas por la superficie de CPA así como por la IL-2 producida localmente [22], y probablemente existan otras condiciones que hagan surgir una actividad reguladora, dependiendo de la naturaleza precisa del encuentro inicial con el aloantígeno. El mecanismo de agotamiento clonal ocurre como resultado de una estimulación crónica del aloantígeno o por el reconocimiento del aloantígeno en condiciones subóptimas. La consecuencia es la eliminación o la inactivación funcional de las células que están respondiendo frente al aloantígeno del donante. El agotamiento clonal puede suceder después de un trasplante hepático, donde un gran número de células presentadoras de antígenos derivadas del donante, migran desde el hígado a los tejidos

linfoides después del trasplante, pudiendo activar este tipo de respuesta [23]. La ignorancia es un mecanismo tan poco frecuente en la inducción de no respuesta o insensibilidad frente a aloantígenos, como la dificultad de introducir células o tejidos del donante sin alertar al sistema inmunitario del huésped de su presencia. Sin embargo, las células encapsuladas, como los islotes de Langerhans antes de su implante, debería permitir que el sistema inmunitario ignore la presencia del injerto. De la misma manera, privar al sistema inmunitario de la ayuda en el momento del alorreconocimiento facilitaría también la supervivencia del injerto a largo plazo [19, 24, 25]. La inmunorregulación es un proceso activo, donde una población de células controla o regula la actividad de otra subpoblación. Se han descrito varias subpoblaciones de leucocitos que tienen la capacidad de controlar las respuestas inmunitarias frente a estimulación aloantigénica en respuestas inmunitarias tanto innatas como adquiridas, agrupadas en la actualidad con el nombre de células T reguladoras (Tregs).

Dentro de los cinco mecanismos para alcanzar tolerancia a aloantígenos, el presente trabajo se centrará en el papel ejercido por las células Tregs en el control de la respuesta aloinmunitaria para lograr tolerancia a aloantígenos, y su papel en el control de rechazo crónico a largo plazo.

1.5. Células T reguladoras

1.5.1. Perspectiva histórica

Los experimentos dirigidos al estudio del control de la respuesta inmunitaria comenzaron en el laboratorio de Gerson a finales de los años 60 y principios de los 70, donde se demostró que la transferencia de células T de ratones tolerantes frente a un determinado antígeno suprimía específicamente la producción de anticuerpos frente a ese antígeno en un ratón receptor [26, 27]. Estos resultados provocaron una proliferación de

estudios en este campo y rápidamente se obtuvieron resultados similares en el control de las respuestas frente a antígenos foráneos así como en la regulación de las células autoreactivas en el contexto de enfermedades autoinmunitarias [28, 29].

El estudio de las distintas subpoblaciones con función reguladora pasó de un creciente interés a caer en el olvido debido al hallazgo de la ausencia del determinante I-J en el locus del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) del ratón, que se había establecido como característico de esta subpoblación [30].

La caracterización de las distintas subpoblaciones de células con función reguladora se ha realizado principalmente en modelos animales murinos, y posteriormente se han ido identificando las subpoblaciones homólogas en humanos.

1.5.2. Células T CD4⁺ reguladoras

Aunque las células supresoras fueron inicialmente identificadas dentro de la población de células T CD8⁺ [31], posteriormente se descubrió que la función supresora podía estar mediada por células T CD4⁺ de manera independiente de las células T CD8⁺ [32-34]. Los experimentos *in vivo* en modelos de ratón a mediados de la década de los 80 llevados a cabo por el grupo de Sakaguchi, despertaron de nuevo el interés sobre las células T CD4⁺ supresoras. En concreto estos estudios estaban centrados en una enfermedad autoinmunitaria órgano-específica inducida en ratones después de una timectomía neonatal. Este grupo demostró que los ratones timectomizados tenían pocas células T CD4⁺ y CD8⁺. Además, la reconstitución de los ratones timectomizados con subpoblaciones ricas en células T CD4⁺, y no en CD8⁺, de ratones singénicos inhibía completamente el desarrollo de la enfermedad [32], señalando que la función reguladora residía en el grupo de células T CD4⁺. Una década más tarde, en 1995, el mismo grupo demostró por primera vez que la supresión mediada por las células T CD4⁺ era función de

una pequeña subpoblación de células T CD4⁺ que expresaban CD25 [33]. La transferencia de células T, a las que se les ha eliminado previamente la subpoblación CD4⁺CD25⁺, en ratones atímicos (nude), llevó al desarrollo de una variedad de enfermedades autoinmunitarias, las cuales podían ser prevenidas mediante la inyección de células T CD4⁺CD25⁺ purificadas. Sin embargo, esto no sucedía cuando se inyectaban células T CD4⁺CD25⁻. Esto sugería que la población de células CD25⁺ tenía un papel en el control de enfermedades autoinmunitarias. A partir de estos resultados, el campo de las células Tregs CD4⁺CD25⁺ había nacido y, junto a él, el interés de numerosos grupos en el estudio de esta subpoblación celular que no ha decaído con el paso de los años [35, 36]. Los protocolos experimentales generales empleados para caracterizar a estas células supresoras *in vivo* ganaron ventaja a raíz de la observación de que los ratones deficientes en células T (ratones timectomizados neonatalmente, ratones *nu/nu* o *Rag^{-/-}*) no desarrollaron enfermedad autoinmunitaria después de la transferencia de esplenocitos de ratones normales a no ser que a las células del bazo se les eliminara la subpoblación de células T CD4⁺CD25⁺. Cuando se eliminaban las células CD4⁺CD25⁺ del bazo de ratones normales, y las células T CD4⁺ restantes eran transferidas a un ratón singénico deficiente en células T, los receptores desarrollaban espontáneamente varias enfermedades autoinmunitarias órgano-específicas (incluyendo, diabetes tipo 1, tiroiditis y gastritis). La reconstitución de estos animales con la población CD4⁺CD25⁺ inhibía el desarrollo de la enfermedad autoinmunitaria [35, 36]. Sin embargo, se ha observado que en muchas situaciones, las células T CD4⁺CD25⁻ son tan efectivas como las células T CD4⁺CD25⁺ en el control de las enfermedades mediadas por células T [37, 38] aunque esta capacidad reguladora es diez veces menor que la de la subpoblación CD25⁺.

Dentro del compartimento de células T CD4⁺ se han descrito numerosas subpoblaciones con función reguladora, que se pueden diferenciar en función de su origen y/o mecanismo de acción. A continuación se detallan dichas subpoblaciones.

1.5.2.1 Células T CD4⁺ reguladoras naturales

Las células T CD4⁺ reguladoras naturales (nTregs) se originan en el timo, y se ha demostrado que ejercen un papel fundamental en el control de enfermedades autoinmunitarias. Se ha confirmado que presentan una elevada afinidad por el complejo formado por autoantígenos-MHC expresado en células del estroma tímico (especialmente en células epiteliales de la corteza tímica) aunque la avidéz no es tan fuerte como para inducir la muerte por activación característica en timocitos en desarrollo [39-41]. Las nTregs expresan constitutivamente una variedad de moléculas de superficie asociadas comúnmente a células T activadas o de memoria, como son el CD25, CD45RB^{low}, CD62L, CD103, antígeno leucocitario T citotóxico (CTLA)-4 ó CD152, y el gen relacionado con la familia del receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides (GITR). En humanos, la mejor manera de seleccionar a las células nTregs con marcadores superficiales sería mediante la detección de una expresión elevada de CD25 [42]. Por este motivo, se ha utilizado dicha estrategia de selección en el presente estudio.

Los progresos en el estudio de las células Tregs surgieron a raíz de estudios con el ratón *Scurfy* y de pacientes con síndrome IPEX (inmunodisregulación, poliendocrinopatía, enteropatía ligada al cromosoma X). Se observó que los síntomas de ambos eran consecuencia de una mutación en un mismo gen que, posteriormente, se demostró clave en el desarrollo de las células Tregs. El síndrome IPEX es un síndrome de inmunodeficiencia ligado al cromosoma X que se asocia a múltiples enfermedades

autoinmunitarias (diabetes mellitus tipo 1, tiroiditis, enfermedad inflamatoria intestinal), dermatitis atópica y a infecciones [43]. La esperanza de vida media del paciente con este síndrome es de 2 años. Los ratones *Scurfy* presentan una linfoproliferación fatal asociada al cromosoma X caracterizada por una inmunopatología multiorgánica muy similar al síndrome IPEX en humanos [44-46]. El gen causante de ambos síndromes es Foxp3 (FOXP3 en humanos), que codifica un represor transcripcional de la familia *forkhead/winged-helix* denominado *Scurfy* [43, 47, 48]. Las similitudes entre las mutaciones de Foxp3 (murino) y FOXP3 (humano), así como la reducción de las células T CD4⁺CD25⁺ reguladoras, llevó a la investigación de la relación entre este gen y el desarrollo y función de las células nTregs. Estos trabajos determinaron que el ARNm y la proteína *Scurfy* se expresaba de forma específica en las células T CD4⁺CD25⁺ reguladoras. En un primer momento no se había observado su expresión en otras subpoblaciones celulares pero posteriormente se demostró su expresión en una pequeña población de células T CD4⁺CD25⁻ que poseía funciones reguladoras [49]. La demostración de que este gen represor era un marcador específico de poblaciones reguladoras, produjo un aumento en el interés del estudio de estas células Tregs.

Actualmente se ha establecido que FOXP3 está directamente implicado en la diferenciación de las células Tregs en el timo y que juega un papel importante en su función efectora [50]. El hecho de que FOXP3 sea un factor de transcripción lo imposibilita para ser utilizado como marcador para seleccionar células vivas y realizar estudios funcionales. Recientemente, se ha demostrado una correlación entre la expresión de FOXP3 y la baja expresión de la cadena α del receptor de la interleucina (IL)-7 (CD127) [51, 52]. Actualmente, se está utilizando este marcador para las estrategias de selección y cultivo de células Tregs.

Se ha investigado en profundidad las características funcionales de las nTregs así como su mecanismo de acción (Figura 2). Se ha demostrado la capacidad de estas células para suprimir respuestas inmunitarias tanto innatas [53, 54] como adquiridas [55-57]. La capacidad supresora de las células Tregs se puede estudiar *in vitro*, utilizando varios títulos de células T CD4⁺CD25⁺ altamente purificadas y células T efectoras, generalmente células T CD4⁺CD25⁻ a las que se añade un estímulo para que proliferen. Bajo estas condiciones, las células T CD4⁺CD25⁺ suprimen la proliferación de las células T CD4⁺CD25⁻ así como la producción de IL-2 de manera dosis-dependiente [55-56, 58].

Las células T CD4⁺CD25⁺ requieren una estimulación específica vía receptor de células T (TCR) e IL-2 para activar sus efectos supresores pero, una vez activadas, su posterior acción supresora puede ser inespecífica, acción que se ha denominado supresión “by-stander” [55, 56, 58]. *In vitro* las células T CD4⁺CD25⁺ son anérgicas, no proliferan ni producen IL-2 en respuesta a estímulos convencionales de células T en placa o con esferas revestidas con anticuerpos frente a CD3, concanavalina A o CPA esplénicas. Aunque este estado puede revertir cuando se enfrentan a estímulos muy fuertes de activación, como la adición exógena de elevadas dosis de IL-2, anti-CD28 o la utilización de células dendríticas (DCs) maduras como CPAs [55, 56, 58-61].

Muchos estudios *in vitro* han demostrado que la supresión es dependiente de contacto con las células diana (Figura 3) [62-65]. Se ha publicado la implicación del factor de crecimiento transformante (TGF)- β expresado en la membrana de las células nTregs en la función supresora de dichas células. El CTLA-4 expresado en las células nTregs es capaz de inducir la expresión de indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO) en DCs induciendo un estado tolerogénico (Figura 4) [66]. En humanos, se ha observado que las células CD4⁺CD25⁺ pueden usar una ruta citolítica dependiente de perforina para inducir una muerte celular dirigida (Figura 2) [67]. Desde el punto de vista de la regulación de las

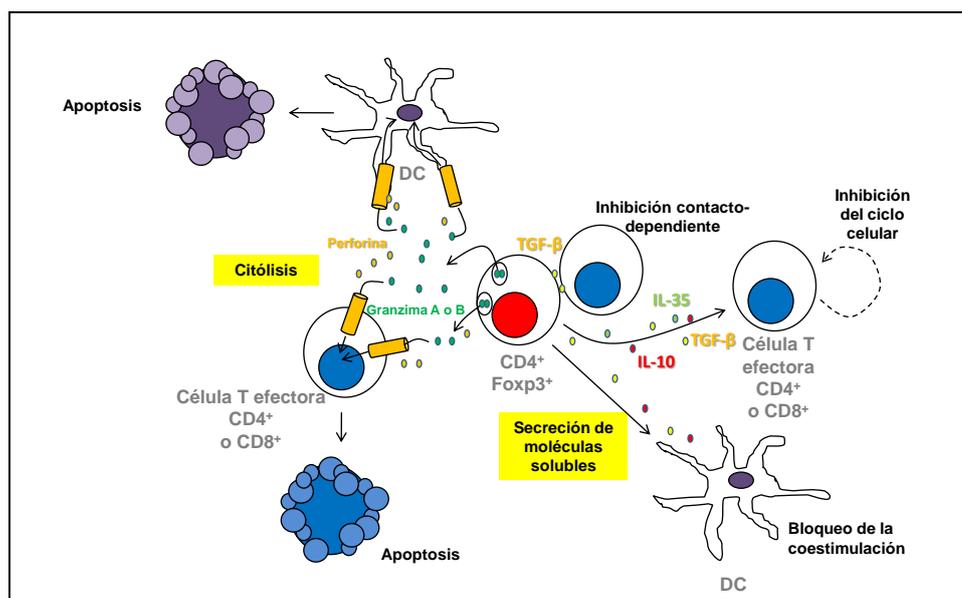


Figura 2. Mecanismos supresores de las células Tregs. La función de las células Tregs se puede llevar a cabo por la secreción de moléculas solubles inhibitorias (IL-10, IL-35 y TGF- β) así como por contacto directo mediante la forma asociada a membrana del TGF- β . Posteriormente se ha demostrado que las células Tregs pueden ejercer su función supresora mediante la producción de granzima A ó B y perforina.

células Tregs, la activación de los receptores tipo Toll (TLRs) en DCs, pueden modular también la función supresora de las células Tregs CD4⁺CD25⁺ [68-70].

1.5.2.2. Células T CD4⁺ reguladoras inducidas

1.5.2.2.1. Células Tr1

Las dos subpoblaciones de células T CD4⁺ reguladoras más relevantes, son las Tregs CD4⁺CD25⁺ [71-72] y las células Tregs de tipo 1 (Tr1) [73, 74]. Estas subpoblaciones difieren en su perfil específico de citocinas secretadas, marcadores celulares, capacidad de diferenciarse en respuesta a estímulos antígeno-específicos así como sus mecanismos de acción para mediar su actividad reguladora [72, 75].

La IL-10 es esencial en el mecanismo de supresión mediado por las células Tregs. Esta citocina tiene efectos antiinflamatorios y supresores sobre la mayoría de las células hematopoyéticas e, indirectamente, suprime la producción de citocinas y la proliferación

de células T CD4⁺ efectoras mediante la inhibición de la capacidad de presentación antigénica de los diferentes tipos de CPA. Se ha demostrado que puede ejercer un efecto estimulador sobre las células T CD8⁺ efectoras, exacerbando su capacidad citotóxica y su proliferación [76-78]. También se ha demostrado su papel como factor antiapoptótico sobre las células B así como su implicación en el cambio de isotipo.

Al primer tipo de Treg productora de IL-10 descrito a nivel clonal se le denominó Tr1 [79]. Dichas células son inducidas por IL-10 tanto *in vivo* como *in vitro*. Se definen por su capacidad de producir niveles elevados de IL-10 y TGF-β. Ambas citocinas se han visto implicadas en la supresión de respuestas efectoras de células T antígeno-específicas.

Las células Tr1 se pueden distinguir de otras subpoblaciones de células T CD4⁺ colaboradoras de tipo 1 (T_{H1}) y de tipo 2 (T_{H2}) porque producen muy poca cantidad de IL-2 y no producen IL-4. Bajo ciertas condiciones experimentales se ha demostrado que pueden producir interferón (IFN)-γ e IL-5, pero a un nivel inferior que las células T_{H1}. El patrón de secreción de citocinas de las células Tr1 es IL-10⁺ IL-5⁺ IL-4⁻ IL-2^{-/+} IFN-γ⁺ [79-81]. A las 4 horas de la activación antígeno-específica de las células Tr1 *in vitro* en presencia de IL-10, se detecta producción de IL-10, siendo el pico entre 12 y 24 horas [81].

Las células Tr1 tienen muy baja capacidad proliferativa pero se pueden expandir en presencia de IL-2 e IL-15, independientemente de su activación vía TCR [82], y su cultivo a largo plazo no altera su fenotipo ni su función. Después de la activación vía TCR, las células Tr1 expresan niveles normales de marcadores de activación, como CD40L, CD69, CD28, CTLA-4, HLA-DR. En un estado de reposo estas células expresan receptores de quimiocinas (CCR) asociadas tanto a T_{H1} (CXCR3 y CCR5) como a T_{H2} (CCR3, CCR4 y CCR8) [83]. Al contrario que las Tregs CD4⁺CD25⁺, en las células Tr1 se ha demostrado que no se expresa constitutivamente Foxp3 [84].

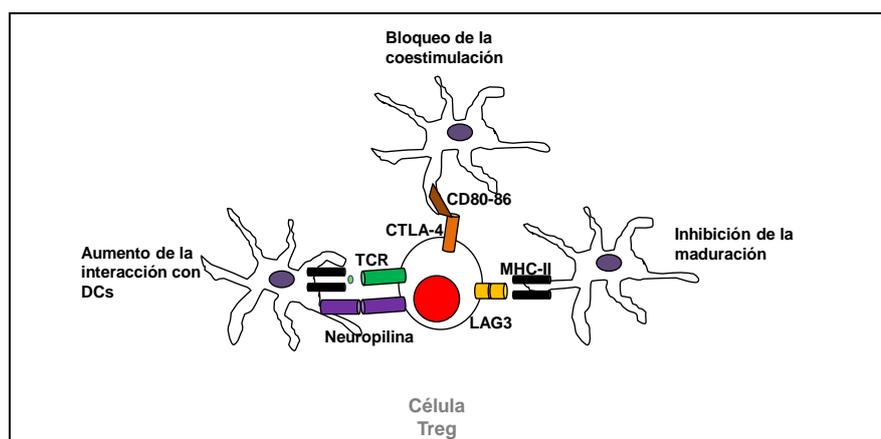


Figura 3. Efectos de la interacción entre las células Tregs y células dendríticas (DCs). La unión del gen de activación de linfocitos (LAG)-3 a la molécula de histocompatibilidad de clase II en DCs puede inducir una reducción en su maduración y capacidad estimuladora [85]. La unión de neuropilina promueve interacciones entre Tregs y DCs inmaduras más prolongadas, impidiendo la unión con células naïve [86]. La asociación del antígeno leucocitario T citotóxico (CTLA)-4, expresado constitutivamente en las células Tregs, con moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en DCs, bloquea la vía coestimuladora para la activación de células naïve. Las interacciones entre DCs y Tregs provocan un retraso en la maduración de DCs e impiden la activación efectiva de las células T naïve.

La regulación de las respuestas inmunitarias se ejerce mediante secreción de citocinas inmunosupresoras IL-10 y TGF- β que suprimen las respuestas de células T naïve y memoria, tanto *in vitro* e *in vivo* [79, 81, 87-89]. Una vez activadas, pueden ejercer su actividad supresora contra otros antígenos, probablemente mediante la liberación local de IL-10 y TGF- β que actúan sobre las células T y las CPAs [90].

La IL-10 produce la disminución de la expresión de moléculas coestimuladoras en las CPAs y reduce la producción de citocinas proinflamatorias. Directamente inhibe la producción de IL-2 y del factor de necrosis tumoral (TNF)- α en las células T CD4⁺ [91]. El TGF- β disminuye la función de las CPAs [92] e inhibe la proliferación y secreción de citocinas en las células T [93].

Las células Tr1 se pueden diferenciar a partir de las células T naïve tanto *in vivo* como *in vitro* y, por lo tanto, pueden considerarse como una parte de la respuesta inmunitaria adquirida. Sin embargo, las nTregs se originan en el timo, así que poseen una

antígeno, pudiendo actuar en fases tardías para detener la respuesta inmunitaria y mantener la tolerancia. Una característica importante que las diferencia de las células nTregs, es la ausencia de marcador específico que las identifique, por lo que no se han podido identificar mediante citometría en sangre periférica.

1.5.2.2.2. Células T_H3

En estudios de tolerancia oral se ha demostrado la existencia de otra subpoblación con capacidad reguladora. La tolerancia oral se ha identificado clásicamente por la supresión específica de la respuesta inmunitaria celular y/o humoral frente a un antígeno tras la administración previa del antígeno por vía oral. De esta manera, el antígeno administrado a bajas dosis por vía oral, induce una regulación celular activa [103] mientras que a dosis elevadas, induce anergia o delección [104, 105].

Durante la investigación de los mecanismos asociados con la tolerancia oral, el grupo de Weiner identificó un tipo de célula reguladora diferente a otras subpoblaciones de células T. Dicha subpoblación era dependiente del TGF- β y fue denominada posteriormente célula T CD4⁺ colaboradora tipo 3 (T_H3) [106].

Estas células se caracterizaron previamente en un modelo de encefalitis autoinmune experimental (EAE) en ratas Lewis tolerizadas por vía oral con bajas dosis de la proteína de unión a mielina (MBP). Las células Tregs identificadas en este modelo fueron CD8⁺ [107] y actuaban mediante la secreción de TGF- β tras activación antígeno-específica [106]. Estas células podían transferir la supresión *in vivo* e *in vitro*. Además, estas células Tregs se podían encontrar en las placas de Peyer a las 24-48 horas tras la ingestión de bajas dosis de MBP [108], sugiriendo que este lugar es importante para la inducción de células con capacidad supresora frente a antígenos tolerizados oralmente.

En el ratón no sólo las células T CD8⁺ tenían capacidad supresora activa, sino también las células T CD4⁺, tanto *in vivo* como *in vitro* [103, 109]. *In vitro* se encontró que tanto las células T CD4⁺ como las CD8⁺ secretaban TGF- β , mientras que sólo las CD4⁺ producían IL-4 e IL-10 [103]. Se clonaron células T CD4⁺ aisladas de ganglios linfáticos mesentéricos de ratones tolerizados oralmente con MBP, donde la mayoría de los clones producían TGF- β activo, además de una u otra citocina T_H2 (IL-4 ó IL-10). Después de la activación antigénica, los clones de células Tregs producían citocinas supresoras (TGF- β , IL-10 ó IL-4) e inhibían la proliferación y producción de citocinas de células T_H1 específicas de MBP. De este modo, suprimían el desarrollo de la EAE inducida por MBP así como la inducida por proteína proteolipídica y esta supresión era revertida con anticuerpos frente a TGF- β *in vivo*. Por lo tanto, se demostró que estos clones eran capaces de producir una supresión *in vivo* no antígeno-específica “by-stander”, mediante la producción de TGF- β [103].

El TGF- β promueve la desviación inmunitaria hacia una respuesta tipo T_H2 y T_H3 mediante la alteración de señales accesorias en las CPAs, impidiendo a los macrófagos producir IL-12 y expresar CD40 [110]. El TGF- β puede incentivar la diferenciación de las células T_H3, proceso que puede ser estimulado por IL-10 ó IL-12 [111].

En humanos se ha demostrado insensibilidad celular en infección crónica por helmintos, mediada por T_H3 o Tr1, que secretan TGF- β e IL-10 y no por citocinas de clase T_H1 ni T_H2 [112]. Además, las células T reactivas a moléculas MHC propias activadas, tienen un perfil de secreción de citocinas que corresponde al fenotipo T_H3 y Tr1 [113]. Se han detectado células secretoras de TGF- β en pacientes con esclerosis múltiple tras administración oral con mielina [114]. Al igual que las células Tr1, no se ha descrito ningún marcador específico que las identifique, por lo que no se han podido identificar en nuestro estudio mediante citometría de sangre.

1.5.3. Células T CD8⁺ reguladoras

La primera subpoblación que se identificó con propiedades reguladoras fue la de células T CD8⁺, las cuales podían ser inducidas *in vitro* y diferenciadas en células supresoras capaces de suprimir a las células T CD4⁺ activadas tras la interacción con el antígeno [115, 116]. En los años 90 se retomaron los estudios en células Tregs CD8⁺, principalmente con la publicación de dos artículos en los que relacionaban a estas células con la EAE [117, 118]. Estos experimentos reflejaban el papel clave de las células T CD8⁺ tanto en la inducción de la resistencia a la enfermedad como el control de los episodios recurrentes en este modelo autoinmunitario.

Los intentos posteriores en definir una subpoblación de células T CD8⁺ reguladora se basaron en la capacidad que tenía la molécula Qa-1 (MHC-I^b) en presentar péptidos endógenos y exógenos a células T CD8⁺. Qa-1 se expresa en linfocitos T CD4⁺ murinos activados, y la supresión mediada por las células T CD8⁺ se bloqueó con anticuerpos dirigidos frente a Qa-1 [119]. Posteriormente el mismo grupo demostró que esta supresión se bloqueaba con anticuerpos anti-TCR, anti-CD8 y con anticuerpos frente a MHC-I^b pero no por anticuerpos frente a MHC-I^a. Se ha postulado que el complejo formado por la molécula Qa-1-autopéptido expresado por las células T CD4⁺ dispara la expresión del TCR en células T CD8⁺. Estas células CD8⁺ se diferencian en supresoras y actúan sobre las células T CD4⁺ que expresan el mismo complejo péptido-Qa-1 [120].

Más recientemente se ha observado que los ratones deficientes en Qa-1 desarrollan EAE severa [121]. El mecanismo de supresión de estas células T CD8⁺ aún es desconocido, aunque debe implicar a la fase de diferenciación de las células T CD8⁺ a células citotóxicas o a la secreción de citocinas supresoras. Algunos estudios sugieren que las células T CD8⁺ humanas pueden ser inducidas para diferenciarse en células reguladoras cuya función está restringida por HLA-E, el homólogo humano de Qa-1

[122]. Estos resultados sugieren un papel de las células T CD8⁺ restringidas a Qa-1 en ratones y HLA-E en humanos, en el control de enfermedades autoinmunitarias.

Posteriormente, dentro de la subpoblación de células T CD8⁺ se identificó a una población CD28⁻ que interactuaba directamente con las DCs y las convertía en tolerogénicas. Estas CPAs expresaban en superficie transcriptos tipo inmunoglobulina (ILT)-3 e ILT-4, al tiempo que presentaban una expresión reducida de moléculas coestimuladoras y no inducían una respuesta antígeno-específica de las células T CD4⁺ [123, 124]. Estas células T CD8⁺CD28⁻ se desarrollaban después de la estimulación repetida de células T humanas *in vitro* con CPAs xenogénicas o con CPAs pulsadas con el antígeno. Estas células CD8⁺ son CD28⁻ y expresan el ARNm de Foxp3. La exposición de monocitos y CPA a esta subpoblación de células Tregs resulta en una expresión elevada de genes que codifican ILT3 e ILT4, miembros de la familia del receptor inhibidor de células natural killer (NK) [124]. Tanto ILT3 como ILT4 presentan largas colas citoplasmáticas con motivos inhibidores basados en tirosinas. La expresión de estos motivos está asociada con la inhibición de la activación del factor nuclear-κB (NF-κB) y con una capacidad reducida de las CPAs a transcribir moléculas coestimuladoras dependientes de NF-κB. Se ha postulado que las Tregs CD8⁺CD28⁻ restringidas a moléculas MHC de clase I que presentan un antígeno específico, primero inducen a las DCs tolerogénicas a expresar ILT, las cuales a su vez, generan células Tregs CD4⁺ [125].

Por analogía a las células Tr1, se ha demostrado una subpoblación de células T CD8⁺ cuyos efectos supresores son mediados por la IL-10. Dichas células fueron descritas tras activación *in vitro* con DCs plasmocitoides, e inhibían la respuesta inflamatoria de las células T CD8⁺ naïve cuando eran estimuladas con monocitos alogénicos, DCs inmaduras o maduras [126]. También se demostró que la generación de estas células Tregs CD8⁺ era dependiente de IL-10. Estudios en humanos han demostrado

que las DCs plasmocitoides podían inducir a las células Tregs CD8⁺ que expresan el CCR7 a producir IL-10 que suprime las respuestas de las células T CD4⁺ específicas de antígeno [127].

Únicamente en modelos de ratón se ha descrito otra subpoblación de células T CD8⁺ que produce IL-10 con capacidad reguladora. Dicha población se caracteriza por la expresión en superficie de la cadena beta de los receptores de la IL-2 e IL-15 (CD122) [128]. Los ratones deficientes en esta subunidad desarrollan un síndrome autoinmunitario, que se puede prevenir mediante la inyección, en el ratón neonato, de células T CD8⁺CD122⁺. Las células Tregs CD8⁺CD122⁺ inhiben la activación tanto de las células T CD4⁺ como de las CD8⁺ *in vitro* en placas con anti-CD3 en ausencia de CPAs. La IL-10 producida por las células T CD8⁺CD122⁺ parece que es el factor responsable de la supresión de la proliferación y de la producción de IFN- γ . Por lo tanto, las células CD8⁺CD122⁺ de ratones deficientes en IL-10 fueron incapaces de suprimir la activación de las células T *in vitro*, pero mostraron la misma actividad *in vivo* suprimiendo la actividad de las células CD8⁺CD122⁻ de ratones de fenotipo salvaje, sugiriendo que las células CD8⁺CD122⁺ podían usar mecanismos supresores adicionales [129]. Recientemente se ha demostrado en un modelo murino de enfermedad de Graves, enfermedad autoinmunitaria caracterizada por la presencia de anticuerpos frente al receptor de la hormona estimulante del tiroides, que la eliminación de esta subpoblación aumentaba la incidencia de hipertiroidismo, sugiriendo un papel en la tolerancia de autoantígenos [130].

1.5.4. Células NKT

Las células T natural killer (NKT) se diferencian a partir de precursores tímicos a través de las señales recibidas durante la maduración tímica mediante el acoplamiento de

su TCR con timocitos corticales que expresan CD1d (molécula del complejo MHC-I no clásica), principalmente expresada en CPA, como DCs, macrófagos y células B. Dicha molécula se caracteriza por la presentación de lípidos a linfocitos T. Este TCR compuesto típicamente por una cadena α y otra β reconoce glicolípidos, tanto propios como los que componen la pared bacteriana Gram negativa, es semi-invariante y en humanos está compuesto por el reordenamiento de los segmentos V α 24-J α 18 en la cadena α y la presencia del segmento V β 11 en la cadena β de linfocitos doble negativos (DN) de sangre CD4⁻CD8⁻ [131, 132]. Existe una conservación evolutiva ya que las células NKT de ratón reconocen un complejo CD1d-glicolípidos humano y viceversa [133].

Las células NKT reconocen a células propias que expresan CD1d [134-137]. Por lo tanto, estas células tienen un comportamiento dual: por un lado, reconocen glicolípidos propios (con capacidad de provocar una respuesta autoinmunitaria) y, por otro, reconocen glicolípidos bacterianos siendo responsables de una respuesta anti-microbiana mediada por la inducción de CD40L y provocando una producción masiva de citocinas y quimiocinas de tipo T_H1 y T_H2.

La proporción de células NKT murinas en el timo es de un 0,5% pero representan hasta un 5% de las células que salen del timo [138, 139]. Una vez que emigran del timo, la localización tisular ha sido profundamente estudiada en la subpoblación NKT murina, caracterizada por la expresión del TCR V α 14, representando aproximadamente un 0,5% de la población T en sangre y ganglios linfáticos periféricos, un 2,5% de la población T en el bazo, ganglios linfáticos mesentéricos y pancreáticos y hasta un 30% en el hígado [140].

Las células NKT han sido asociadas a la regulación de respuestas inmunitarias en un amplio rango de enfermedades autoinmunitarias, infecciosas y cáncer. Pueden modular positiva o negativamente las respuestas inmunitarias mediante la estimulación de

secreción de citocinas T_{H1} , T_{H2} o inmunoreguladoras. Se ha demostrado un papel en la regulación de enfermedades autoinmunitarias [141, 142]. Este papel *in vivo* se cree que puede ser debido al aumento de su actividad pro-tumoral cuando se activa vía TCR, secretando grandes cantidades de IL-4, INF- γ , así como TGF- β e IL-10, citocinas de las que se conoce su propiedad reguladora [137, 143-145].

Tanto en las células NKT murinas como en las humanas, la molécula más eficiente para activar la mayoría de las células NKT es la α -Galactosil-Ceramida (α -GalCer) [146]. Cuando se activan, las células NKT responden con una potente producción de citocinas entre 1-2 horas después de la unión con el TCR. Las células NKT son capaces de fabricar citocinas de tipo T_{H1} (INF- γ , TNF- α) y T_{H2} (IL-4, IL-13) simultáneamente después de su estimulación *in vivo* [147-149].

Se han propuesto dos modelos de activación de las células NKT [150]. El primero sugiere que dentro de las células pueden coexistir dos subtipos, unas células NKT tipo T_{H1} y otras tipo T_{H2} , las cuales dirigen inmunidad T_{H1} y respuestas tolerogénicas o inmunidad T_{H2} , respectivamente. El segundo modelo sugiere que las células NKT constituyen una subpoblación homogénea que alcanza fenotipos funcionales de acuerdo al diferente ambiente de citocinas en el que se activen y la afinidad con la que se asocie el antígeno al TCR.

1.5.5. Células T reguladoras doble negativas

El 1-2% de los linfocitos maduros de ratones y humanos son $TCR\alpha\beta^+CD4^-CD8^-$ doble negativos (DN) y no expresan marcadores de las células NK como NK1.1 y DX5 en ratones ni CD16 y CD56 en humanos. Las células T DN contribuyen al mantenimiento de la tolerancia a tejidos propios [151] y a la prevención de rechazo del trasplante [152], enfermedad injerto contra huésped (GVHD) [153] y crecimiento tumoral [154]. Aún se

desconoce si todas las células T DN poseen funciones reguladoras así como su origen y los requerimientos para su desarrollo. Los timocitos doble positivos se pueden diferenciar en células T DN cuando son estimuladas en cultivo con antígenos de alta afinidad [155]. Sin embargo, esta característica no ha sido probada en las células DN periféricas [152]. Las células DN periféricas se desarrollan en ratones timectomizados tras reconstitución con médula ósea sin células T de ratones singénicos, sugiriendo que las células T DN reguladoras, pueden ser una población heterogénea de células que se pueden desarrollar tanto intratímica como extratímicamente. Una vez que se estimulan a través del TCR con el antígeno específico, tanto *in vitro* como *in vivo*, las células T DN reguladoras expresan marcadores de activación como CD25 y CD69, pero no CD44 ni CD28. Las células T DN reguladoras activadas poseen un único perfil de secreción de citocinas que difiere de otras subpoblaciones de células T. Las células T DN reguladoras murinas producen predominantemente IFN- γ , factor de necrosis tumoral (TNF)- α y pequeñas cantidades de TGF- β pero no IL-4, IL-10 ni IL-13 [152]. Las células T DN reguladoras periféricas humanas, también expresan altas cantidades de IFN- γ y cantidades indetectables de IL-2, IL-4 e IL-10 [156].

Debido a la falta de homogeneidad en su capacidad supresora, esta subpoblación no ha sido estudiada en este trabajo.

1.6. Células T reguladoras en trasplante

1.6.1. Células T reguladoras naturales en trasplante

Aunque las Tregs se han estudiado ampliamente en el contexto del control de enfermedades autoinmunitarias, se ha demostrado en numerosos modelos de trasplante que previenen el rechazo e inducen tolerancia al injerto.

La primera evidencia del control de la alorespuesta por parte de las Tregs se encontró en un modelo de trasplante cardíaco en ratas con tolerancia a largo plazo y observaron la capacidad de transferir tolerancia de forma adaptativa por medio de células $CD4^+CD25^+$ [157]. A partir de este estudio se ha demostrado que las células $CD4^+CD25^+$ mantienen la tolerancia al trasplante de forma dominante y que las células $CD4^+CD25^+$ de los animales que toleran los injertos, gracias a distintos regímenes inmunosupresores, pueden transferir tolerancia al trasplante de manera donante-específica [158]. *In vivo*, las células Tregs específicas de aloantígeno son capaces de ejercer varias acciones sobre las células efectoras, entre las que destacan la inhibición de la proliferación, inhibición de la producción de citocinas y anticuerpos [97]. Otra observación importante es que, en ausencia de Tregs, varios tratamientos por sí solos no son capaces de inducir tolerancia al aloinjerto [159]. Varios estudios han demostrado que los protocolos de inducción de tolerancia basados en la utilización de anticuerpos monoclonales frente a CD4, CD8, CD40L lleva a la generación de Tregs *in vivo* [160-162], lo que puede sugerir que la utilización de distintos tratamientos inmunosupresores puede influir de manera beneficiosa o deletérea en la supervivencia de las Tregs, uno de los objetivos que planteamos en el presente trabajo de tesis doctoral.

Las células T pueden reconocer los aloantígenos mediante dos vías. La primera en la que las moléculas MHC de las CPAs del donante son reconocidas directamente por los linfocitos T del receptor (alorreconocimiento directo). La segunda vía en la que tras ser procesados por las CPA del receptor, pequeños fragmentos (alopéptidos) son presentados a los linfocitos T del receptor en el contexto de una MHC de clase II; dicha vía se conoce como ruta indirecta de alorreconocimiento (Figura 6). El reconocimiento directo es el responsable de rechazo agudo mientras que el indirecto puede ser responsable tanto de rechazo agudo como de rechazo crónico o pérdida a largo plazo del injerto [163, 164].

La vía de reconocimiento indirecto es la ruta dominante de inmunorregulación utilizada por Tregs [165]. Posteriormente se ha demostrado la presencia de células T $CD4^+CD25^+$ dentro del injerto tolerizado [166], y éstas pueden tener una especificidad indirecta frente a los antígenos del donante [158]. Esta observación plantea la posibilidad de que las células Tregs $CD4^+CD25^+$ con aloespecificidad anti-donante indirecta, podrían ser agentes potenciales para promover la tolerancia en trasplante clínico [72, 167]. Por lo tanto, uno de los objetivos del presente estudio ha sido la valoración de las células Tregs como marcador de rechazo a largo plazo.

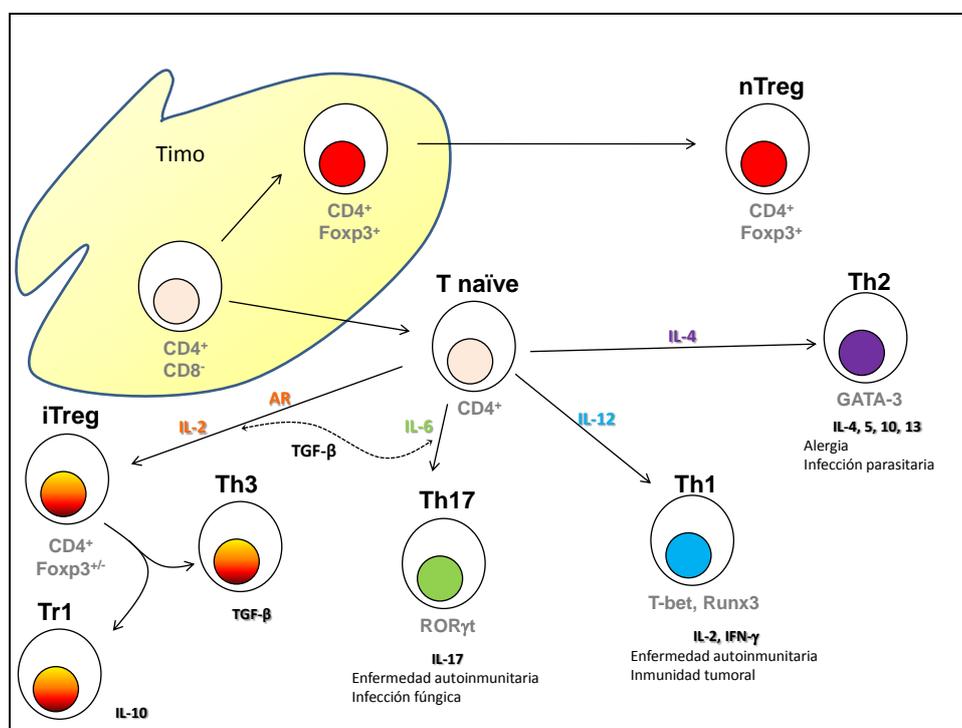


Figura 5. Desarrollo de subpoblaciones de células Tregs y efectoras. Los timocitos, tras madurar en el timo, se diferencian en células T naíve que migran a la periferia y, en función de las citocinas presentes en el momento de la activación, se podrán diferenciar en diferentes subpoblaciones de células T. La activación en presencia de IL-12 inducirá una respuesta tipo Th1 caracterizada por la producción de IL-2 e interferón (IFN)- γ . Si la activación antigénica se produce en presencia de IL-4, se producirá una respuesta tipo Th2, caracterizada por una producción de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Cuando la presentación antigénica se produce en un medio con IL-2 y factor de crecimiento transformante (TFG)- β , la célula T naíve se convertirá en célula T reguladora inducida (iTreg) que en función del mediador soluble producido IL-10 ó TGF- β , se denominará célula Treg tipo 1 (Tr1) o célula Th3, respectivamente. Cuando la presentación antigénica se produce en presencia de TGF- β e IL-6 las células T naíve se diferenciarán en células productoras de IL-17 (Th17). A diferencia de las células iTreg, en el timo se diferencian las células Tregs naturales (nTregs) de timocitos que expresan Foxp3.

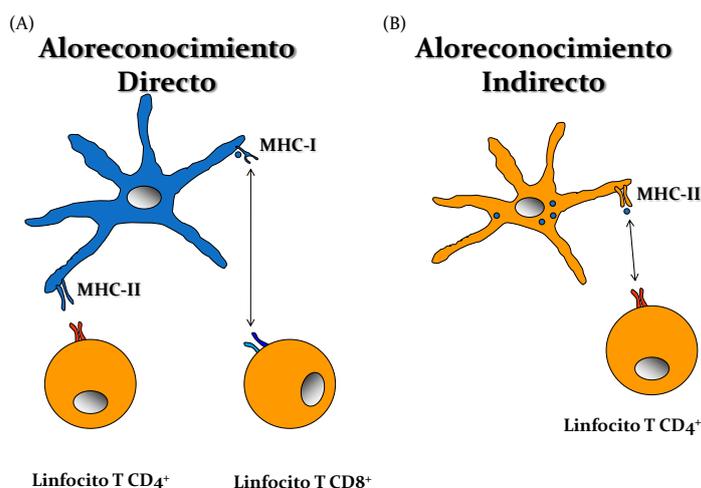


Figura 6. Vías de alorreconocimiento. Se representa la vía de alorreconocimiento directo (A) en la que después del trasplante, las células del donante (color azul) son reconocidas directamente tanto por linfocitos CD4⁺ como CD8⁺ del receptor (color naranja). Posteriormente, los antígenos del donante son procesados en los órganos linfoides y las células presentadoras de antígenos del receptor muestran los alo péptidos a los linfocitos CD4⁺ en el contexto de moléculas de histocompatibilidad de clase II (B).

En el campo de tolerancia a trasplante, las células nTregs CD4⁺CD25⁺ pueden controlar la enfermedad injerto contra huésped (GVHD) tras trasplante de médula ósea alogénico [168-170]. En experimentos de transferencia, varios estudios han mostrado que la administración de Tregs CD4⁺CD25⁺, especialmente la población CD62L⁺, inhibe GVHD y preserva la actividad injerto frente leucemia tras trasplante de médula ósea [169].

En estudios *in vivo*, se ha demostrado que las Tregs aloantígeno-específicas son capaces de prevenir el rechazo iniciado por las células T CD4⁺ tanto en trasplante de órganos [158, 161, 171] como de médula ósea [33, 172, 173].

Una vez activadas las Tregs ejercen su función supresora inhibiendo la producción y secreción de citocinas, disminuyendo la expresión de moléculas coestimuladoras y de adhesión, inhibiendo la proliferación, induciendo anergia o eliminando las células

efectoras mediante inducción de muerte celular o incluso provocando la conversión de células T efectoras hacia un fenotipo regulador, circunstancia que se ha denominado “tolerancia infecciosa” [174-176]. Aunque los mecanismos moleculares implicados en esta conversión necesitan más estudios en profundidad, recientemente se ha observado que este mecanismo de “tolerancia infecciosa” puede deberse a la inducción de enzimas que consumen aminoácidos esenciales por parte de las células Tregs antígeno-específicas que reducen la señalización de la diana de Rapamicina (mTOR) lo cual provoca la expresión de Foxp3 en las células T naïve aunque también se ha demostrado *in vitro* la dependencia de TGF- β [177, 178]. *In vivo* parece que las citocinas T_H2 tienen un papel importante [179], mientras que en las células Tregs humanas *in vitro* se ha demostrado un papel para TGF- β e IL-10 [175, 176].

Otra acción descrita en el campo del trasplante de las células Tregs es la supresión asociada, ya que se ha demostrado que cuando se activan, las Tregs pueden suprimir la activación y/o proliferación de otras células T respondedoras o efectoras frente a antígenos presentados por las mismas CPAs de una manera no específica, tanto *in vivo* como *in vitro* [55, 180].

Como se ha mencionado anteriormente, el mecanismo de acción de las Tregs es contacto-dependiente [181, 182] y necesitan una activación vía TCR. Una vez activadas, su función supresora es completamente inespecífica [55, 56, 58]. El modelo de supresión de las nTregs es independiente de TGF- β e IL-10, aunque las células T CD4⁺CD25⁺ inducidas a partir de células CD4⁺CD25⁻ en presencia de Tregs *in vivo* o *in vitro*, podría ser dependiente de IL-10 o de TGF- β [172, 175, 183].

1.6.2. Células T reguladoras inducidas en trasplante

1.6.2.1. Células Tr1 en trasplante

La primera evidencia en humanos de que las Tr1 estaban implicadas en el mantenimiento de la tolerancia periférica *in vivo* fue a raíz de estudios en pacientes con inmunodeficiencia combinada severa, trasplantados con células pluripotentes alogénicas HLA-incompatibles. A pesar de esta histoincompatibilidad, estos pacientes no desarrollaron GVHD en ausencia de terapia inmunosupresora. En el plasma de estos pacientes se detectaron niveles elevados de IL-10, y se pudo aislar *in vitro* una porción significativa de las células T derivadas del donante que fueron específicas de los antígenos HLA del huésped y produjeron niveles elevados de IL-10 [81].

El desarrollo espontáneo de tolerancia a aloinjertos renales y hepáticos en pacientes trasplantados se ha asociado con la presencia de células T CD4⁺ que suprimen las respuestas de células T naïve mediante la producción de IL-10 o TFG-β [184].

En un modelo de trasplante de islotes pancreáticos se ha observado que la inyección de IL-10 y Rapamicina (Rapa) en ratones diabéticos indujo tolerancia tras el trasplante y, además, esta tolerancia podía transferirse de manera antígeno-específica a ratones naïve mediante la transferencia adaptativa de células Tr1 de los ratones tolerantes [185].

En un modelo de trasplante renal en primates no humanos, se ha demostrado un mayor número de células CD4⁺ que expresan IL-10 en el grupo de primates que toleran el injerto después del tratamiento con anti-CD3 y deoxispergualina para inducir tolerancia, que en aquellos primates no trasplantados [186].

1.6.2.2. Células T_H3 en trasplante

Se ha publicado que las células reguladoras que secretan TGF- β juegan un papel crítico en la tolerancia del aloinjerto inducida mediante transfusión previa de sangre del donante [187] y el TGF- β secretado, tanto por células T CD4⁺ como por células no-T, puede tener un papel importante en la tolerancia inducida por la proteína soluble “rechazante” inyectada en la cámara anterior del ojo de ratones [188].

En otros modelos experimentales, incluyendo los de trasplante, la inducción de una respuesta T_H2 mediante el transporte vía oral del antígeno podría ser importante en las respuestas inmunitarias supresoras [189]. Un estudio demostró que la introducción intratraqueal de esplenocitos alogénicos o de alo péptidos 7 días antes del trasplante cardíaco era capaz de inducir supervivencia a largo plazo de los injertos cardíacos alogénicos, y se demostró que la producción de citocinas T_H2, incluida la IL-10, era fundamental en la inducción de tolerancia, ya que anticuerpos frente a IL-10 suspendían la tolerancia mientras que los anticuerpos frente a TGF- β no lo conseguían [190]. Además estas células T CD4⁺ reguladoras tipo T_H2 pueden tener una aloespecificidad indirecta [191, 192]. Están apareciendo nuevas evidencias de que las células T_H3 pueden solaparse con las células nTregs CD4⁺CD25⁺ ya que el TGF- β está implicado en la supresión mediada por ambas subpoblaciones de células Tregs.

1.6.3. Células T reguladoras CD8⁺ en trasplante

Dentro de la subpoblación CD8⁺, recientemente se ha demostrado el papel protector de las células T reguladoras CD8⁺CD28⁻, en un modelo de trasplante hepático en rata [193].

En humanos se han descrito líneas de células T CD8⁺CD28⁻ alo- y xeno-específicas que pueden inducir tolerancia a trasplante [194]. Estas células podrían ser aisladas *in vitro* después de múltiples rondas de estimulación y se observó que inhibían a las células T CD4⁺ aloreactivas inhibiendo la capacidad de las CPAs a inducir activación de las células T. La interacción entre las células T CD8⁺CD28⁻ supresoras y las CPAs, no provoca la muerte de las CPAs, sino que lleva a la inducción de ILT3 e ILT4 en su superficie [195]. Como resultado, estas CPAs adquieren un potencial tolerizante y son incapaces de expresar moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86 [124]. Para ejercer este efecto, se requiere un contacto célula a célula entre las células Tregs CD8⁺CD28⁻ y las CPAs, que es antígeno-específico [196]. Las células Tregs CD8⁺CD28⁻ se caracterizan por una baja capacidad proliferativa *in vitro* y por unas características morfológicas y funcionales similares a las de células T activadas o memoria [196]. Las células Tregs CD8⁺CD28⁻ aisladas de pacientes trasplantados no tenían actividad citotóxica frente a células del donante y mostraron una expresión elevada de receptor inhibitor de muerte CD94 [196].

Recientemente se ha publicado un trabajo en trasplante hepático de donante vivo donde se observa una asociación directa entre niveles elevados de células CD8⁺CD28⁻ y mejor función del injerto. Además, observan una relación inversa con los niveles de inmunosupresión y episodios de rechazo [197].

1.6.4. Células NKT en trasplante

A pesar de la existencia de evidencias que sugieren un papel para las células NKT en la respuesta inmune al trasplante, no se sabe aún si son capaces de reconocer el aloantígeno directamente, ya que la molécula CD1d en la que le son presentados los aloantígenos, no es polimórfica [198]. Las células NKT se pueden activar por las

citocinas secretadas debido a la inflamación inespecífica motivada por el mismo trasplante.

En un modelo de diabetes inducida por estreptozotocina, se observó que las células NKT promovían la pérdida del injerto de islotes de Langerhans ya que los ratones NKT^{-/-} mostraban 2 veces más supervivencia comparado con los ratones de fenotipo salvaje [199]. Se observó, además, que el daño del injerto era mediado por IFN- γ secretado por las células NKT que provocó un reclutamiento de neutrófilos y el posterior rechazo [200].

A pesar de estos ejemplos, se han realizado otros estudios de células NKT en el contexto de trasplante concluyendo que las células NKT pueden disminuir en vez de exacerbar el rechazo del injerto. En un modelo de trasplante de piel, se observó que los ratones deficientes en CD1d, rechazaban los injertos rápidamente. Además, la activación de las células NKT con α -GalCer aumentó significativamente la supervivencia del injerto [201].

En estudios de inducción de tolerancia, se ha demostrado en un modelo de trasplante cardíaco que ratones tratados con anticuerpos monoclonales α -LFA/ICAM-1 ó CD28/B7 aceptaban el injerto mientras que los ratones deficientes en NKT, con el mismo tratamiento, los rechazaban [202]. El papel esencial de las NKT en la inducción de tolerancia se han demostrado en modelos de trasplante cardíaco [203], de xenotrasplante de islotes [204] y de trasplante de córnea [205]. Aunque la implicación de las células NKT puede ser específica de trasplante ya que se ha demostrado que se alcanza una inducción de tolerancia en un número de modelos de trasplante en ausencia de células NKT [206].

Se ha atribuido el efecto beneficioso en los modelos de trasplante cardíaco y cutáneo a la producción de IL-10, que se observó disminuida en ratones CD1d^{-/-} [201, 203, 207].

Para explicar estos resultados contradictorios, se ha postulado que una respuesta débil al aloinjerto puede permitir a las células NKT controlar la respuesta frente al injerto. Sin embargo, cuando se produce una fuerte alorespuesta tipo T_H1, la contribución de las células NKT puede verse ensombrecida.

1.6.5. Células T reguladoras doble negativas en trasplante

La transferencia antes del trasplante de células específicas del donante puede inducir tolerancia permanente a un injerto de piel en modelos con una disparidad en las MHC-I [152]. Las células Tregs DN o los clones de células Tregs DN obtenidas a partir del bazo de los ratones tolerantes pueden suprimir la proliferación *in vitro* de las células T anti-donante. La infusión únicamente de las células Tregs DN lleva a una prolongación significativa de la supervivencia del injerto específica del donante en modelos de trasplante cutáneo [152] y cardíaco [208]. Las células Tregs DN aisladas de aloinjertos tolerados, fueron capaces de suprimir a las células T anti-donante de una manera antígeno-específica, sugiriendo que las células Tregs DN pueden inhibir la función de las células T anti-donante a nivel sistémico y local [209]. En un modelo de xenotrasplante cardíaco de rata a ratón, la combinación de la transferencia de células donante específicas y una reducción transitoria de las células T CD4⁺ resultó en una aceptación permanente del xenoinjerto. Las células Tregs DN del receptor estuvieron significativamente elevadas y podían suprimir la proliferación de las células T específicas anti-donante pero no la de células T estimuladas con antígenos sin identidad HLA [210]. La transferencia adaptativa de las células Tregs DN de los ratones que aceptaron el xenoinjerto podían suprimir la

proliferación *in vivo* de las células T CD4⁺ xenoreactivas y prevenían el rechazo mediado por las células T CD4⁺ de una manera donante específica [210].

La supresión mediada por las células Tregs DN es antígeno específica [152, 208-210]. Las células Tregs DN que expresan los péptidos HLA adquiridos, pueden matar específicamente a las células T CD8⁺ que porten la misma especificidad en su TCR que las células T DN reguladoras [156]. Este resultado sugiere que la adquisición del complejo péptido-MHC es utilizado por las células Tregs DN para mediar la supresión específica de antígeno. Este proceso requiere el contacto célula a célula y la interacción entre Fas y FasL [211]. Las células Tregs DN de humanos pueden adquirir también los complejos péptido-MHC de las CPAs mediante un mecanismo contacto-dependiente.

Recientemente se ha publicado un estudio en humanos trasplantados con células madre hematopoyéticas donde se ha observado una correlación entre el descenso de células Tregs DN y el desarrollo de GVHD [212].

2. HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

En el trasplante de órganos sólidos, y especialmente en el trasplante renal en que se centra el presente trabajo de tesis doctoral, el desarrollo de fármacos inmunosupresores supuso un avance espectacular en su desarrollo clínico. Actualmente, se reconoce que la inmunosupresión funciona bien en la prevención del rechazo agudo de un trasplante renal y ha conseguido prolongar la supervivencia del injerto y del paciente trasplantado. El problema que se plantea ahora es como conseguir evitar la pérdida de los injertos renales a largo plazo, lo que motiva que muchos de los receptores de un aloinjerto renal deban ser retrasplantados. Las hipótesis aceptadas en la actualidad apuntan a la necesidad de conseguir un verdadero estado de tolerancia frente a los aloantígenos para poder evitar esa pérdida tardía, debida principalmente al proceso que se describe histológicamente como fibrosis intersticial y atrofia tubular.

En la última década el conocimiento de los procesos básicos que controlan la tolerancia inmunitaria ha experimentado un avance extraordinario. Entre estos elementos, la identificación de unas células con capacidad inmunorreguladora ha sido uno de los principales y ha abierto un campo de trabajo con un potencial enorme. Las primeras evidencias del papel relevante que esta población celular obtenidas en experimentos *in vitro* han sido confirmadas en diversos modelos de enfermedad. Ha sido recientemente cuando se ha producido el traslado de los hallazgos *in vitro* y de modelos experimentales a patología humana.

La búsqueda de inducción de tolerancia inmunitaria en el trasplante renal probablemente deba centrarse en mecanismos que actúan a nivel periférico, más que en mecanismos de tolerancia central. En este sentido, las células con capacidad inmunorreguladora descritos en la última década y, en especial, las células Tregs CD4⁺

parecen ser las candidatas más factibles para inducir tolerancia verdadera en receptores de injertos renales. Existen evidencias acerca del posible papel de estas células en trasplante renal humano. Sin embargo, muchas de ellas proceden de estudios unicéntricos con series pequeñas de pacientes trasplantados seleccionados y en estudios de corte transversal. Dado el papel tolerogénico adscrito a estas células, es lógico pensar que puedan emplearse como biomarcadores en la monitorización del paciente trasplantado renal que permitan predecir el establecimiento de un estado de tolerancia inmunitaria real y reducir el nivel de inmunosupresión farmacológico empleado. Para ello, el primer paso debe ser establecer como se regula el número y función de estas células *in vivo* en el paciente trasplantado renal durante su seguimiento rutinario en el periodo post-trasplante, donde pueden intervenir todo tipo de eventos inflamatorios relacionados con inmunorregulación (necrosis tubular, rechazo, infecciones, etc). Además, aunque el objetivo de un marcador de tolerancia inmunitaria no es actuar como marcador de función del injerto, es posible que ese marcador guarde relación con la función del injerto renal y pueda funcionar como biomarcador de función renal que se adelante a un fallo del injerto.

Por otro lado, existe un factor adicional que, en el caso del trasplante renal, está siempre presente, salvo casos esporádicos de abandono del tratamiento. Se trata de la inmunosupresión farmacológica, la cual no debe entenderse como un extremo totalmente opuesto al estado de tolerancia inmunológica, sino que es posible obtener distintos grados de tolerancia en presencia de inmunosupresión farmacológica. Hay evidencias, sobre todo *in vitro*, acerca del papel tolerogénico de ciertos inmunosupresores como Rapamicina. Sin embargo, este efecto tolerogénico no está establecido claramente *in vivo* en pacientes. Menos aún está explorado el efecto tolerogénico de los tratamientos de inducción que se emplean en el periodo

peritrasplante en pacientes trasplantados de “riesgo” inmunológico. Es posible que el empleo de un tipo de inmunosupresor u otro induzca cambios en el número y función de las poblaciones celulares en sangre a las que se ha adscrito un papel inmunorregulador. Finalmente, no sólo el tipo de inmunosupresor sino también la concentración sanguínea del inmunosupresor empleado puede influir de forma diferente en los niveles de células inmunorreguladoras circulantes.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

1. Monitorizar en sangre los números de linfocitos y sus tipos principales durante los dos primeros años de trasplante renal.
2. Cuantificar los cambios que se producen en los números y función supresora de células con fenotipo inmunorregulador en sangre.
3. Determinar el efecto que distintas situaciones clínicas inflamatorias (necrosis tubular aguda, retrasplante, rechazo agudo) ejercen sobre los números de células reguladoras.
4. Comparar el efecto sobre el número y función de las células reguladoras en sangre de los fármacos inmunosupresores empleados habitualmente en el tratamiento del trasplante renal.
5. Estudiar la asociación entre los cambios del número de células reguladoras circulantes y la función renal durante los dos primeros años post-trasplante.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los aspectos ético-legales planteados por el presente proyecto fueron sometidos a la aprobación del Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV), que aprobó su realización.

4.1. Pacientes

Para dirigir las cuestiones planteadas en este estudio, se diseñaron dos estudios paralelos, uno prospectivo en el que se incluyó a pacientes con enfermedad renal terminal (ERT) en el momento previo a trasplante, a los que se realizó un seguimiento durante 2 años. Se desarrolló otro estudio retrospectivo en el que se incluyó a pacientes trasplantados renales de larga evolución, con función renal estable.

4.1.1. Estudio prospectivo

En el estudio prospectivo, se recogió una serie de 39 pacientes trasplantados renales en el HUMV durante los años 2005 y 2006, de acuerdo a los criterios del Comité de Ética del Hospital, cada paciente firmó el consentimiento informado antes de ser incluido en el estudio prospectivo. Se analizaron 5 muestras de los pacientes, la primera se recogió justo en el momento previo al trasplante, y las cuatro siguientes se obtuvieron cada 6 meses hasta los dos años de seguimiento en el Servicio de Nefrología del HUMV. Las características demográficas, clínicas e inmunológicas de los pacientes incluidos en el estudio prospectivo se reflejan en la Tabla 2.

Tabla 2. Características demográficas, clínicas e inmunológicas de los pacientes incluidos en el estudio prospectivo.

		n	Media
Sexo (V/M)		(33/6)	
Rechazo agudo (S/N)		(12/27)	
Nº de rechazos (0-1-2-3)		(27/9/2/1)	
Criterios de rechazo según Banff 07	Celular (Ia-Ib-IIa)	(9/1/5)	
	Humoral	1	
IS inducción (No-TG-antiCD25)		(26/2/11)	
IS inicial (Rapa-CNI)		(4/35)	
IS mantenimiento (CsA/Tac/Rapa)	T=0 meses	(2/33/4)	
	T=6 meses	(2/36/1)	
	T=12 meses	(0/36/3)	
	T=18 meses	(0/33/4)	
	T=24 meses	(0/31/5)	
Retrasplante (S/N)		(12/27)	
Necrosis tubular aguda (S/N)		(7/32)	
Incompatibilidades A (0-1-2) Media		(4/21/14)	1,26
Incompatibilidades B (0-1-2) Media		(5/12/22)	1,44
Incompatibilidades DR (0-1-2) Media		(6/22/11)	1,13
Sensibilidad (Presencia/Ausencia) anticuerpos		(11/27)	
Edad donante: rango (Media)		17-75	(50,9)
Edad receptor: rango (Media)		22-74	(51,4)

TG: timoglobulina; Rapa: rapamicina; CNI: inhibidores de calcineurina; CsA: ciclosporina; Tac: tacrolimus.

4.1.2. Estudio retrospectivo

En el estudio retrospectivo se solicitó el consentimiento informado a los pacientes para la obtención de muestras sanguíneas. Se obtuvieron muestras por venopunción de sujetos sanos para su posterior comparación con los pacientes estudiados. Se seleccionó a una cohorte de 64 receptores de trasplante renal llevado a cabo en el HUMV entre los años 1999 y 2003. Los pacientes fueron divididos en 2 grupos en función del régimen inmunosupresor en el momento del estudio. Un grupo estaba formado por pacientes trasplantados renales tratados con Rapamicina (Rapa) y no con inhibidores de la calcineurina (CNI), y el otro grupo formado por pacientes tratados con CNI y no con Rapa. En ambos grupos, la mayoría de los regímenes inmunosupresores incluía prednisona y/o MMF (Tabla 3). Los pacientes que recibían CNI fueron seleccionados del registro de trasplantes para coincidir en el tiempo de seguimiento del trasplante con los pacientes tratados con Rapa. Se recogió muestra de sangre periférica para el estudio al menos un año después del trasplante. Los pacientes

tratados con Rapa habían recibido Rapa sin CNI durante al menos un año antes del análisis. Este grupo de pacientes, tratados con Rapa, fue heterogéneo y se subdividió en otros 3 subgrupos: uno agrupaba a los pacientes tratados con Rapa sin CNI (n=5, pacientes libres de CNI), otro grupo de pacientes tratados con Rapa y CNI en donde los CNI fueron retirados posteriormente (n=11, retirada de CNI) y otro grupo en el que los pacientes fueron tratados inicialmente con CNI y se cambió a un tratamiento con Rapa (n=16, conversión de CNI). Se establecieron dos grupos control, uno de 20 donantes sanos y otro de pacientes con ERT previa a trasplante. Las muestras de los grupos control fueron recogidas durante los años 2004 y 2005. La incorporación del grupo con ERT se estableció como control debido a que este grupo de pacientes no han recibido inmunosupresión previa.

4.1.3. Datos clínicos

Los datos inmunológicos clínicos y demográficos de los receptores de trasplante renal y donantes fueron obtenidos de nuestro registro de trasplantes (Tablas 2 y 3). La función renal se estimó mediante el grado de filtración glomerular (FG) calculado a partir de la ecuación de la modificación en la dieta en enfermedad renal (MDRD) [213]. Las actuales evidencias sugieren que esta fórmula MDRD-4 (en la que intervienen 4 variables: concentración sérica de creatinina, edad, sexo y etnia) es una opción válida y comparable a otras fórmulas de medida de la FG en el trasplantado renal [214]. El grado de mejora o detrimento en la función renal fue estimado mediante el incremento de la filtración glomerular (Δ FG). El Δ FG fue calculado usando la siguiente fórmula: (FG actual - FG inicio)/meses de seguimiento. Por definición, un Δ FG positivo indicó una mejora en la función renal.

Tabla 3. Características clínicas y demográficas de los pacientes incluidos en el estudio retrospectivo.

	Tratamiento		Control	
	Rapamicina	CNI	ERT	Donantes
N	32	32	25	20
Edad receptor (años)	50,4±10,5	55,8±13,6	49,2±13,9	45,7±15,6
Edad donante (años)	44,5±16,5	45,7±17,2		
% mujeres	28,6	33,3	20,8	30,7
Etiología de fallo renal crónico (% glomerular)	52,4	26,2	30,8	
Panel reactivo actual de anticuerpos (%)	6,2±19,2	2,6±7,5	6,4±15	
Panel reactivo máximo de anticuerpos (%)	11,5±24,7	9,2±16,8	2,8±9,2	
Trasfusiones previas (media±DE)	2,2±4,3	2,0±2,9	0,8±1,4	
Histocompatibilidades (media): A/B/DR	1,3/1,3/1,0	1,2/1,3/1,2		
Tiempo de isquemia fría, horas (media±DE)	21,4±7,0	19,6±4,9		
Retraso de la función renal (%)	40,5	35,7		
Episodios de rechazo agudo (%)	28,6	19		
Infecciones agudas y/o crónicas (%)	65,9	76,2		
Inmunosupresión adicional				
-Monoterapia	2	0		
-Prednisolona	13	11		
-MMF	9	11		
-MMF+Prednisolona	8	10		

DE: desviación estándar; CNI: inhibidores de la calcineurina; ERT: enfermedad renal terminal; MMF: ácido mofetil micofenolato

4.2. Muestras sanguíneas

4.2.1. Muestras del receptor

Se recogieron 30 mL de sangre periférica en tubos *Z serum sep Clot Activator* (Ref. 456073, Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemania), tubos tratados con etilen diamino-tetraacético (EDTA) (Ref. 454021, Greiner bio-one) y tubos con heparina sódica (Ref. 455051, Greiner bio-one) repartidos en 5, 5 y 20 mL respectivamente. A partir de la sangre almacenada en tubo *Z serum sep Clot Activator* se extrajo el suero mediante centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente el suero se congeló a -20°C hasta su posterior utilización. Con la sangre extraída en tubo con heparina sódica se realizó una purificación de leucocitos mediante la técnica de gradiente de densidad con Ficoll Histopaque 1077 (Ref. H8889, Sigma-Aldrich, Ayrshire, Reino Unido), centrifugando durante 20 minutos a 2000 rpm a temperatura ambiente. Se recogió la población de leucocitos separada por gradiente de densidad y se procedió a un lavado con tampón salino fosfato (PBS), centrifugando

durante 10 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente. Una vez terminada la centrifugación se decantó el PBS y el sedimento restante se resuspendió en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 para la realización del Sorting (véase clasificación celular).

Con la sangre extraída en tubo con EDTA se realizó una citometría a partir de 100µL de sangre teñidos con 5µL de los anticuerpos correspondientes al panel mostrado en la tabla 4 que permitió el estudio de las principales subpoblaciones linfocitarias. Con la muestra de sangre restante se purificaron leucocitos por medio de Ficoll Histopaque, siguiendo el mismo procedimiento explicado anteriormente. Una vez obtenidos los leucocitos, 10^6 se utilizaron para marcaje intracelular con un anticuerpo monoclonal dirigido frente al factor de transcripción Foxp3 (necesario para la identificación de la subpoblación de células Tregs $CD4^+$) y el resto de leucocitos se congelaron para su posterior extracción de ARN.

4.2.2 Muestras de donante

Se extrajeron esplenocitos del donante según el método descrito [215]. Se criopreservaron a -190°C en un tanque de N_2 líquido hasta su posterior utilización en cultivos mixtos linfocitarios. Como solución de criopreservación se utilizó medio RPMI y suero fetal bovino (FBS) (decomplementado durante 45 minutos a 56°C) dilución 1:1 y posteriormente se añadió 10% de dimetil sulfóxido (DMSO).

4.3. Citometría

4.3.1. Marcaje superficial

Se marcaron tanto los leucocitos extraídos por Ficoll Histopaque, como la sangre extraída en tubo con EDTA (sangre total) con los anticuerpos monoclonales (AcMo) según el panel detallado en la Tabla 4. Se incubó durante un mínimo de 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación se añadió 1 mL de solución de lisis (Solución de Lisis, Cat. 349202, Becton Dickinson, San José, Estados Unidos) a los tubos marcados con AcMo y se incubaron durante un mínimo de 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el período de incubación se añadieron 2 mL de PBS a cada tubo para lavar el exceso de AcMo sin fijar y se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm a una temperatura de 4°C. Finalizada la centrifugación se decantaron y resuspendieron las células con 2mL de PBS y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Se decantaron los tubos y se resuspendieron en un volumen de 250µL de PBS para ser adquiridos en el citómetro FACS-Scalibur.

4.3.2. Marcaje intracelular

Se extrajeron 10^6 leucocitos con Ficoll Histopaque y se marcaron con AcMo frente antígenos de superficie (Tabla 4). Una vez transcurrida la incubación con los anticuerpos de superficie durante 30 minutos, se realizó un lavado con 1 mL de PBS a 4°C, centrifugando los tubos durante 5 minutos a 1500 rpm a una temperatura de 4°C. Posteriormente se continuó con el protocolo de marcaje intracelular aconsejado por el fabricante (eBioscience, San Diego, Estados Unidos), añadiéndose 1 mL de una solución de fijación y permeabilización, e incubando durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente se añadió 1 mL de una solución de lavado y se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm a 4°C. Se decantó y se añadieron 2µL de suero de rata incubándose

durante 15 minutos en oscuridad a 4°C, transcurrido este tiempo se añadieron 5µL del AcMo anti-human-Foxp3-PE (clon-PCH101, eBioscience) durante 30 minutos en oscuridad a 4°C. Finalizado el tiempo de incubación, se añade 1mL de solución de lavado y se centrifuga durante 5 minutos a 1500 rpm a 4°C. Se decanta y se resuspende con 250µL de PBS previa adquisición en el citómetro.

Tabla 4. Panel de anticuerpos monoclonales utilizado para el estudio de las diferentes subpoblaciones linfocitarias

	Fluorocromos			Subpoblaciones estudiadas	
	FITC	PE	PerCP APC		
1	CD4	CD8	CD3	Linfocitos T colaboradores (CD3 ⁺ CD4 ⁺) Linfocitos T citotóxicos (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	
2	CD4	CD25	CD3	Linfocitos Tregs CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{high}	
3	CD25	GITR	CD4	Linfocitos Tregs CD4 ⁺ CD25 ^{high} GITR ⁺	
4	CD4	CD25	HLA-DR	Linfocitos Tregs CD4 ⁺ CD25 ^{high} HLA-DR ⁺	
5	CD3	CD19	CD45	Linfocitos B (CD3 ⁻ CD19 ⁺)	
6	CD3	CD16/CD56		Linfocitos Natural Killer (CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺) Linfocitos NKT (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺)	
7	TCRαβ	TCRγδ	CD3	Linfocitos T (TCR-αβ y TCR-γδ)	
8	CD45RA	CD25	CD4	Linfocitos Tregs CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD45RA ⁻	
9	CD8	CD28	CD3	Linfocitos T supresores CD3 ⁺ CD28 ⁻	
10	CD25	CD38	CD4	Linfocitos Tregs CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD38 ⁺	
11	CD27	CD28	CD8	CD3	Linfocitos Tregs CD3 ⁺ CD28 ⁻ CD27 ⁺
12	CD27	CD25	CD4	CD3	Linfocitos Tregs CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD27 ⁺
13	CD25	Foxp3	CD4	CD3	Linfocitos Tregs CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{high} FOXP3 ⁺

FITC: Isocianato de fluoresceína

PE: Ficoeritrina

PerCP: Proteína clorofila-a peridina

APC: alofocianina

TCR: receptor de células T

Todos los anticuerpos tiñeron en superficie celular a excepción de Foxp3 que se realizó intracelularmente (material y métodos).

4.4. Clasificación celular (Sorting)

Las células resuspendidas en RPMI se centrifugaron durante 10 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente, se decantó y se añadieron 5µL de AcMo anti-CD4 conjugado a alofococianina (APC) (Becton Dickinson) y anti-CD25 conjugado a ficoeritrina (PE). Se incubó durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Transcurrido el período de incubación, se añadió RPMI y se centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente, se decantó y resuspendió en 1mL de RPMI para ser separados mediante FACS-Aria en función de la expresión de CD4 y CD25. Las células CD4⁺CD25⁻ fueron utilizadas como “efectoras” y las células CD4⁺CD25^{high} (alta expresión de CD25) como “reguladoras”. En el año 2007 se demostró que una baja expresión de CD127 (cadena alfa del receptor de IL-7) junto a la expresión de CD4 y CD25 definía una población con unas propiedades reguladoras más eficientes [51], desafortunadamente casi todos los estudios funcionales se realizaron con la antigua clasificación, debido a que la publicación coincidió con el final del seguimiento de los pacientes.

4.5. Cultivos mixtos linfocitarios

Una vez obtenidas las células “efectoras” y “reguladoras” mediante clasificación por sorting, los cultivos linfocitarios fueron realizados en cabinas de flujo laminar bajo condiciones de esterilidad. Las placas de cultivo estériles (96 pocillos con fondo en “U”, Nunc, Kamstrupvej, Dinamarca) se mantuvieron en estufa a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

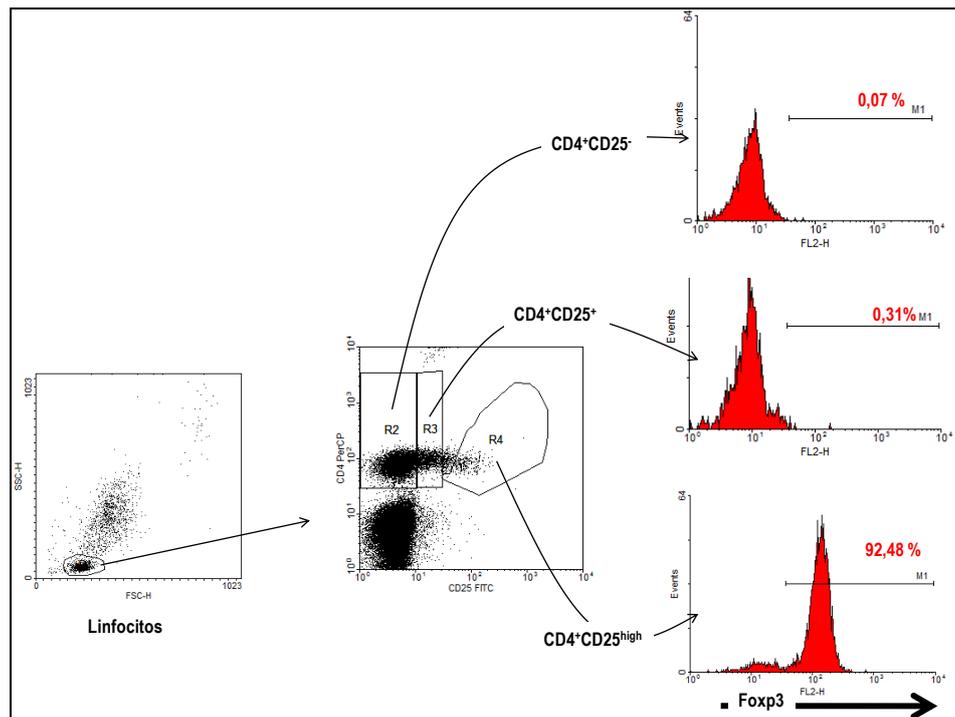


Figura 7. Expresión de la molécula Foxp3 en la subpoblación CD4⁺. Células mononucleares de sangre periférica aisladas con Ficoll y marcadas extracelularmente con anti-CD25-FITC y anti-CD4-PerCP para clasificar las diferentes subpoblaciones de células T CD4⁺: CD25⁻ (efectoras), CD25⁺ (activadas) y CD25^{high} (Tregs) en el FACS-Aria y realizar el cultivo mixto de linfocitos. Se observa más de un 90% de marcaje intracelular Foxp3⁺ en la subpoblación considerada Treg, mientras que las células recientemente activadas (CD4⁺CD25⁺) pueden expresar Foxp3 transitoriamente (hasta un 5% del total) y las células T CD4⁺ efectoras que poseen menos de 1% de Foxp3⁺.

Como células estimuladoras se utilizaron esplenocitos específicos de donante (DSC), extraídos en el momento del trasplante y criopreservados a -190°C. Se descongelaron en cada punto de control, añadiendo medio RPMI y posterior centrifugación a 1500 rpm a 4°C. Para valorar la capacidad de control de la respuesta donante-específica de las células Tregs, los esplenocitos de donante se irradiaron (50 Gy) y añadieron, cocultivadas con células efectoras y a continuación se añadieron las células Tregs (ajustando a un ratio células efectoras/reguladoras 1:0,625). Cada condición se repitió por triplicado (Tabla 5).

Para el cultivo se utilizó el medio RPMI-1640 (Cat. E15-840, PAA Laboratories GmbH, Haidmannweg, Austria), suplementado con 10% de FBS de complementado

(Cat. A15-101, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria), 5% de Glutamina (Cat. BE17-605E, BioWhittaker, Verviers, Belgium), 2,5% de Na-piruvato (Cat. BE13-115E, BioWhittaker), 2,5% de Bicarbonato (Cat. L1713, Biochrom AG, Berlin, Alemania), 2,5% de aminoácidos no esenciales (Cat. K0293, Biochrom AG), 1,25% de Penicilina/Streptomicina (Cat.A2212, Biochrom AG). Una vez preparado, el medio de cultivo se pasó por filtro Millex estéril de 0,22µm (Millipore, Cork, Irlanda) y se almacenó para su posterior utilización dentro del primer mes.

A las 72 horas se recogieron 100µL de los sobrenadantes de cada uno de los cultivos para su posterior análisis. Posteriormente se añadió 1µCi de timidina ³H/pocillo y se incubó en estufa a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ entre 20-24 horas.

Transcurrido este tiempo, se recogieron los cultivos (PHD™ cell harvester, Cambridge Tec, Cambridge, Estados Unidos) y se transfirió el contenido a un papel de filtro (filtro de fibra de vidrio tipo A/E, Cat. 61638, PALL Corporation), se dejó en la estufa durante un mínimo de 2 horas y a continuación se añadieron 2mL de líquido de centelleo. Finalmente se midió la incorporación de timidina en un contador de centelleo.

Tabla 5. Diseño del cultivo mixto linfocitario para valoración de función supresora de las células Tregs.

	Control -			Control -			Control +			Experimento		
	Esplenocitos (Donante)			Efectoras (Receptor)			Esplenocitos + Efectoras			Esplenocitos + Efectoras + Tregs		
Donante	100µL	100µL	100µL				100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL
Efectoras (CD25⁺)				100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	50µL	50µL	50µL
Tregs (CD25^{high})										50µL	50µL	50µL
Medio	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL						

Donante: esplenocitos del donante recuperados en el momento previo al trasplante. Se añadieron los volúmenes reflejados en placa de 96 pocillos con fondo en U

4.6. Enzimo-inmunoensayos (ELISAs):

4.6.1. ELISA para la determinación de IL-17 en suero: (eBioscience)

Según recomienda el fabricante, se resuspendió el tampón de lavado en 1L de H₂O deionizada, y posteriormente se hizo pasar por un filtro de 0,22µm. Posteriormente se prepararon la solución de bloqueo, el anticuerpo de detección y la solución de avidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) en las condiciones aconsejadas por la casa comercial. Se diluyó el estándar (IL-17) con el diluyente con el objeto de realizar una curva con una concentración máxima de 500 pg/mL y mediante diluciones seriadas llegar hasta una concentración mínima de 3 pg/mL. A continuación se añadieron 100µL por pocillo de los estándares en los pocillos apropiados en una placa de 96 pocillos pre-sensibilizada con anticuerpo de captura frente a IL-17 proporcionada por el kit comercial. Se añadieron 100µL del suero de cada paciente, se cubrió la placa con un adhesivo y se incubó durante toda la noche a 4°C.

Se aspiró el contenido de cada pocillo y se lavó la placa 5 veces con el tampón apropiado (proporcionado por el kit) dejando empapada la placa durante un minuto para aumentar la eficacia del lavado. A continuación se añadieron 100µL de anticuerpo de detección y se incubó durante una hora a temperatura ambiente con la placa tapada. Transcurrido el período de incubación, se procedió a lavar en las mismas condiciones a las explicadas anteriormente.

A continuación se añadieron 100µL de Avidina-HRP y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar este período, se realizaron 7 lavados en las condiciones expuestas y se añadieron 100µL de sustrato, incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalizado este tiempo, se añadieron 50µL de una solución 1N de H₂SO₄ con el fin de detener la reacción enzimática y poder medir la

absorbancia en un espectrofotómetro con un filtro de 450nm y calcular la concentración sérica de IL-17 interpolando los resultados con los obtenidos de la recta patrón de los valores estándar.

4.6.2. ELISA para la determinación de IL-23 en suero: (eBioscience)

Se resuspendió el tampón de lavado en 1L de H₂O deionizada, y posteriormente se hizo pasar por un filtro de 0,22µm. Posteriormente se preparó el tampón de sensibilización con el que se diluyó el anticuerpo de captura frente a IL-23 a la concentración recomendada por el fabricante. A continuación se sensibilizó una placa de ELISA (NUNC Maxisorp) de 96 pocillos añadiendo 100 µL por pocillo y se incubó durante toda la noche a 4°C.

El día siguiente se prepararon la solución de bloqueo, el anticuerpo de detección y la solución de avidina-HRP en las condiciones aconsejadas por la casa comercial. Se diluyó el estándar (IL-23) con el diluyente con el objeto de realizar una curva con una concentración máxima de 2000 pg/mL y mediante diluciones seriadas llegar hasta una concentración mínima de 3 pg/mL.

Se aspiró el contenido de cada pocillo y se lavó la placa 5 veces con el tampón apropiado dejando empapada la placa durante un minuto para aumentar la eficacia del lavado. A continuación se añadieron 100µL por pocillo de la solución de bloqueo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con la placa tapada. Posteriormente se lavó la placa en las mismas condiciones y se añadieron los valores estándar de IL-23 en los pocillos apropiados así como 100µL del suero de cada paciente, se cubrió la placa con un adhesivo y se incubó durante toda la noche a 4°C.

Se aspiró el contenido de cada pocillo y se lavó la placa. A continuación se añadieron 100µL de anticuerpo de detección y se incubó durante una hora a temperatura ambiente con la placa tapada. Transcurrido el período de incubación, se procedió a lavar en las mismas condiciones a las explicadas anteriormente.

A continuación se añadieron 100µL de avidina-HRP y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar este período, se realizaron 5 lavados en las condiciones expuestas y se añadieron 100µL de sustrato, incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalizado este tiempo, se añadieron 50µL de una solución 1N de H₂SO₄ con el fin de detener la reacción enzimática y poder medir la absorbancia en un espectrofotómetro con un filtro de 450nm y calcular la concentración sérica de IL-17 interpolando los resultados con los obtenidos de la recta patrón de los valores estándar.

4.6.3. ELISA para la determinación sérica de CD30 soluble (sCD30):

(Bender MedSystems, Vienna, Austria)

Se prepararon el tampón de lavado, el tampón de dilución y el conjugado-HRP según indica el fabricante.

Antes de iniciar la técnica, se lavaron las placas de 96 pocillos pre-sensibilizadas 2 veces, con 300µL/pocillo con tampón de lavado sin dañar el fondo del pocillo y sin dejar que se seque la placa, se añadieron 100µL de tampón de dilución en todos los pocillos de la primera columna. Se preparó la curva realizando diluciones seriadas con el estándar de sCD30 hasta 7 veces (con un rango de 100ng/mL hasta 1,6 ng/mL). Se añadieron 75µL de tampón de dilución al resto de pocillos de la placa y a continuación se echaron 25µL de suero de los pacientes. A continuación se preparó el conjugado-

HRP y se añadieron 50µL por pocillo. Se cubrió la placa y se incubó durante 3 horas en un rotor a 100 rpm.

Posteriormente se lavaron las placas 3 veces en las mismas condiciones y se añadieron 100µL por pocillo de la solución de sustrato-TMB y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente evitando la exposición directa a la luz. Cuando la densidad óptica del estándar de 100ng/mL alcanza valores de 0,6 medida en un espectrofotómetro con un filtro de 620nm, se añaden 100µL por pocillo de la solución de parada.

Se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro usando un filtro de 450nm y se calculó la concentración sérica de sCD30 interpolando los resultados con los obtenidos de la recta patrón de los estándares.

4.7. Análisis Estadístico

Para determinar la distribución normal de las variables numéricas se empleó el test de Kolmogorov-Smirnov. Se compararon las variables numéricas entre dos grupos usando el test U de Mann-Whitney y el test χ^2 en el caso de variables categóricas. El test de Wilcoxon fue empleado para analizar las diferencias observadas entre muestras pareadas. Las correlaciones entre diferentes parámetros se realizaron mediante el cálculo del coeficiente de Spearman y con el Modelo Lineal General.

Todos los análisis estadísticos se efectuaron con el programa informático SPSS versión 15.0 para Windows (SPSS Inc, Chicago, Illinois, Estados Unidos).

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. BLOQUE I: Estudio Prospectivo

5.1.1. Análisis de los números absolutos de subpoblaciones leucocitarias en pacientes trasplantados renales

Se analizaron los números absolutos de células leucocitarias en 39 pacientes trasplantados renales desde el momento previo al trasplante hasta los 2 años de seguimiento post-trasplante, realizando controles cada 6 meses. La tabla 2 resume las características demográficas, clínicas e inmunológicas de los pacientes incluidos en el estudio prospectivo.

Tras el trasplante renal, se objetiva un descenso significativo del número absoluto de leucocitos, que se mantiene durante todo el seguimiento hasta los dos años, con respecto a los niveles previos al trasplante (Figura 8). Sin embargo, al analizar el número absoluto de linfocitos, no se observan diferencias significativas en ninguno de los puntos de control analizados, debido al aumento del porcentaje de linfocitos en los pacientes a partir del sexto mes tras el trasplante (Tabla 6-Anexo I). Esta observación es importante ya que todas las subpoblaciones estudiadas pertenecen a la población linfocitaria, por lo que cualquier diferencia que se observe se deberá a un cambio real de dicha subpoblación. En las distintas poblaciones de linfocitos T, los niveles de células T CD4⁺ se mantienen estables durante el primer año post-trasplante observándose un descenso significativo a partir del año y medio. Al contrario, la subpoblación T CD8⁺, aumenta significativamente desde el primer año post-trasplante. En la subpoblación de linfocitos B (CD19⁺), se observa un descenso a los 6 meses y una reconstitución significativa al año post-trasplante. El mismo patrón se observa en la subpoblación de células NK (CD3⁻

CD16⁺CD56⁺), alcanzando los niveles basales al año y medio y dos años post-trasplante (Tabla 7-Anexo I).

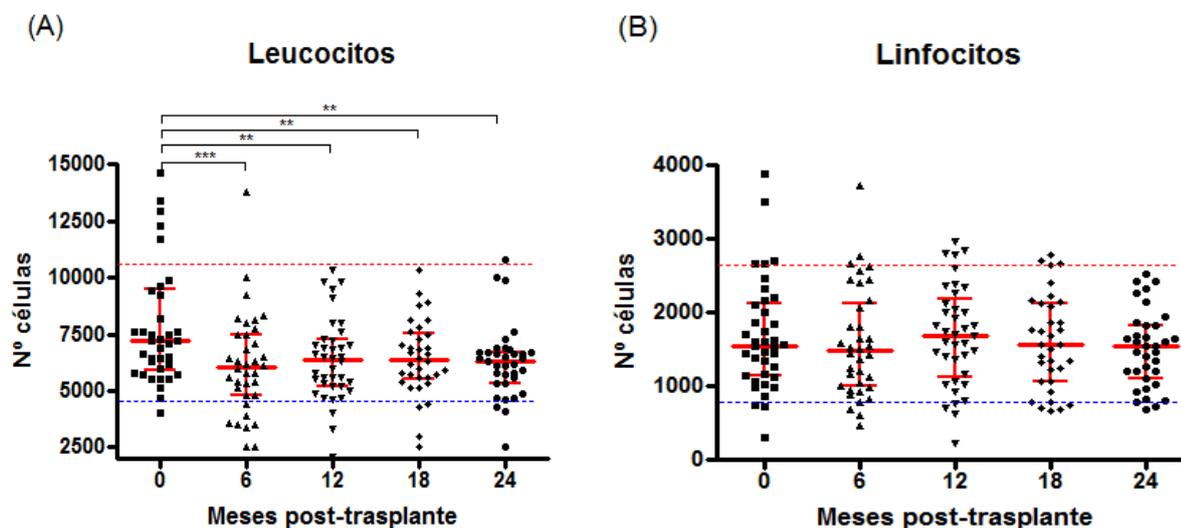


Figura 8. Evolución del número absoluto de células sanguíneas en pacientes con ERT después de trasplante renal. Se midió el número de leucocitos (A) y de linfocitos (B) antes del trasplante (0) y cada 6 meses después del trasplante. La línea roja horizontal representa la mediana y el rango intercuartílico. Se muestra el rango de la población sana, límite superior (línea rayada roja) y límite inferior (línea rayada azul). Se indica el grado de significación estadística de la diferencia de medianas en los diferentes puntos de control, obtenido en el *test de Wilcoxon* para muestras pareadas: ** ($p < 0,01$) y *** ($p < 0,001$). En el resto de puntos de control no se observan diferencias significativas.

Se estudiaron varias subpoblaciones con función reguladora, aunque el trabajo se centró en la subpoblación Treg CD4⁺ (CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺) por ser el tipo celular más implicado en la inmunoregulación del trasplante. En pacientes trasplantados se detecta un descenso significativo a los 6 meses post-trasplante. Al cabo de un año, el número de células Tregs CD4⁺ se recupera parcialmente, sin llegar a los niveles pre-trasplante y transcurridos 18 meses después del trasplante, los niveles superan a los del momento previo a trasplante siendo este aumento más evidente a los 2 años post-trasplante (Figura 9A).

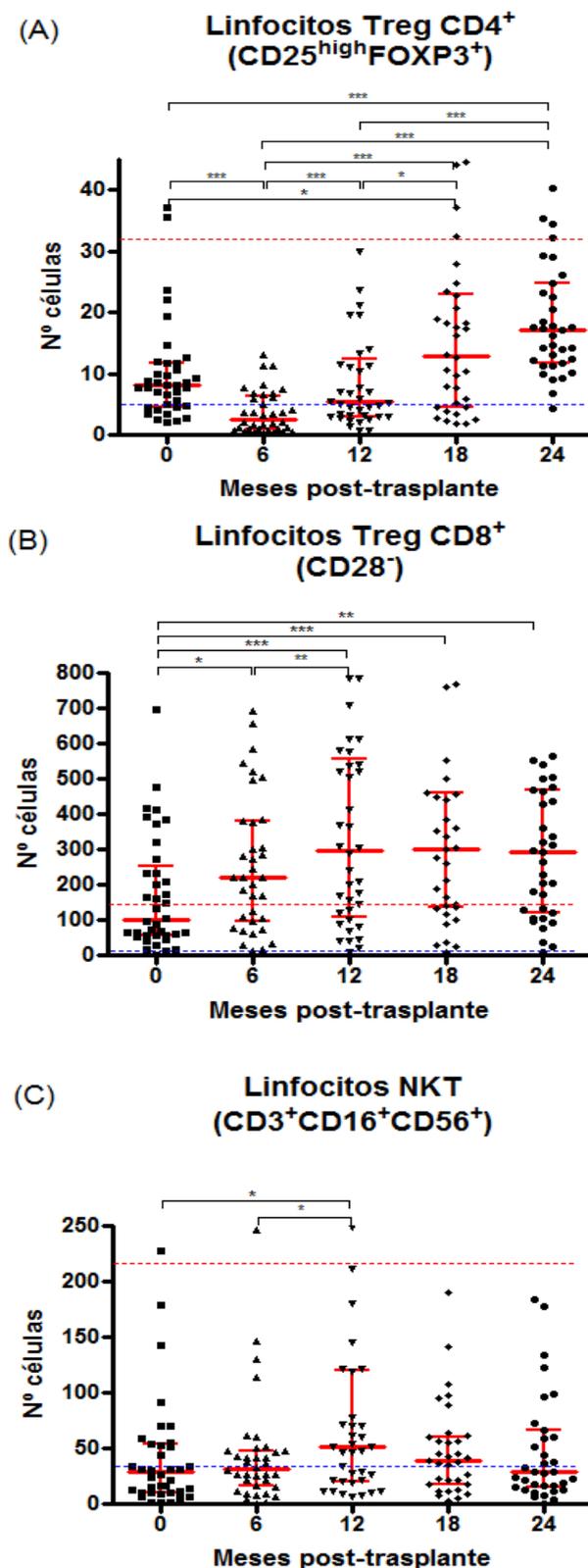


Figura 9. Evolución del número absoluto de células T reguladoras sanguíneas en pacientes con enfermedad renal terminal (ERT) después del trasplante. Se calculó el número de células Tregs CD4⁺ (A), CD8⁺ (B) y células NKT (C) en sangre de pacientes con ERT antes del trasplante (0) y cada 6 meses después del trasplante. La línea roja horizontal representa la mediana y el rango intercuartílico. Se muestra el rango de la población sana, límite superior (línea rayada roja) y límite inferior (línea rayada azul). Se indica el grado de significación estadística de la diferencia de medianas en los diferentes puntos de control, obtenido en el *test de Wilcoxon* para muestras pareadas: * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$) y *** ($p < 0,001$). En el resto de puntos de control no se observan diferencias significativas.

Con respecto a otra subpoblación con función supresora demostrada, los niveles de células T $CD8^+CD28^-$ aumentan significativamente a los seis meses, alcanzando su nivel más elevado al año de seguimiento, manteniéndose elevados durante todo el seguimiento (Figura 9B).

Los valores absolutos de células NKT ($CD3^+CD16^+CD56^+$) se mantienen bajos a los seis meses post-trasplante, aumentando de manera significativa al año de seguimiento, momento desde el cual descienden paulatinamente hasta los 2 años (Figura 9C).

Se evaluó la capacidad inhibidora de las células $CD4^+CD25^{high}$ en cultivo mixto de linfocitos. Las células $CD4^+CD25^-$ (células T efectoras) fueron aisladas y clasificadas mediante citometría de flujo-FACS-sorter (detallado en la sección de material y métodos y en la Tabla 5) y cultivadas con esplenocitos del donante, solas o junto a células $CD4^+CD25^{hi}$ (células Tregs). Los resultados demostraron que las células $CD4^+CD25^{high}$ representadas en la Figura 9A fueron en todo momento, excepto a los 6 meses del trasplante, supresoras de la capacidad proliferativa de las células $CD4^+CD25^-$ del receptor *in vitro* (Figura 10). Por lo tanto, las células $CD4^+CD25^{high}$ caracterizadas en el presente estudio como Tregs $CD4^+$, funcionan como células reguladoras *in vitro*.

Uno de los mecanismos responsables del desarrollo de rechazo del injerto que se han propuesto, ha sido el desequilibrio entre el número de células T $CD4^+$ efectoras (principalmente $CD25^-$) y células Tregs ($CD4^+CD25^{high}$). Se analizó el ratio de células T efectoras/reguladoras durante el seguimiento y se observó un aumento significativo de casi 10 veces a los 6 meses después del trasplante (Figura 11).

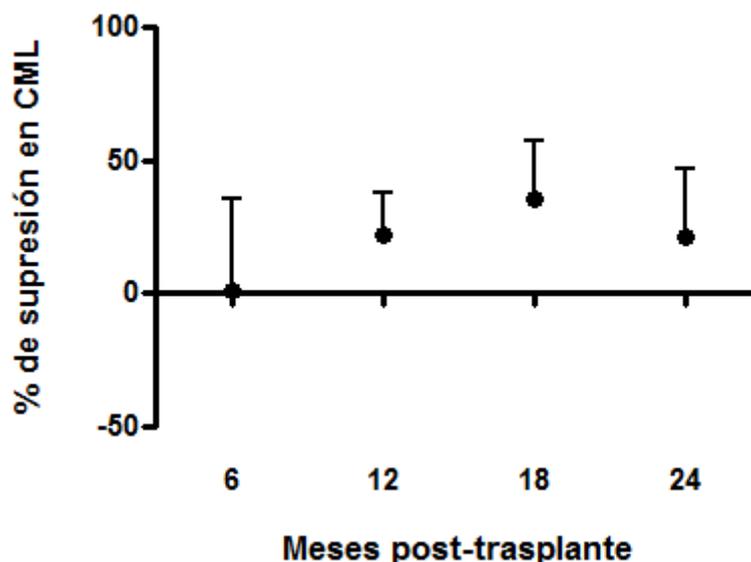


Figura 10. Función supresora de las células Tregs $CD4^+CD25^{\text{high}}$ en cultivo mixto linfocitario primario. Las células $CD4^+CD25^-$ del huésped, como efectoras (E), fueron cultivadas por triplicado solas o junto a células T $CD4^+CD25^{\text{high}}$ en un cultivo mixto con esplenocitos del donante (D) irradiados como células estimuladoras, en ratios células T $CD4^+CD25^-/CD4^+CD25^{\text{high}}$ de 1/0,625. Se representan los resultados de las medianas y el percentil 75 del porcentaje de inhibición de la proliferación [calculado como % supresión = $1 - (\text{cpm cultivo Tregs+E+D}/\text{cpm cultivo E+D})$] de la respuesta tras estimulación con células del donante ejercida por las células Tregs (células T $CD4^+CD25^{\text{high}}$) a los 6, 12, 18 y 24 meses del trasplante.

5.1.2. Comparación de las subpoblaciones linfocitarias en pacientes trasplantados en función de diversas situaciones clínicas.

Una vez analizada la dinámica de las diferentes subpoblaciones linfocitarias en la población trasplantada completa de la serie prospectiva, la siguiente fase del estudio se centró en la posible influencia de diversos eventos clínicos sobre las diferentes subpoblaciones linfocitarias y células Tregs.

En el registro del Servicio de Nefrología se recogen todos los datos clínicos de los pacientes a estudio. Se han considerado relevantes para el presente estudio: la presencia o ausencia de NTA, de un trasplante previo y de un episodio de RA. Estos eventos se han valorado debido a su potencial interés, ya que todos ellos tienen un componente

inflamatorio, con la consecuente implicación de las diferentes subpoblaciones celulares del sistema inmunitario. Quizá alguna subpoblación pueda servir como marcador de predicción de alguno de estos eventos clínicos, aunque debido al reducido número de pacientes no se realizaron estudios de *odd* ni *hazard ratio*.

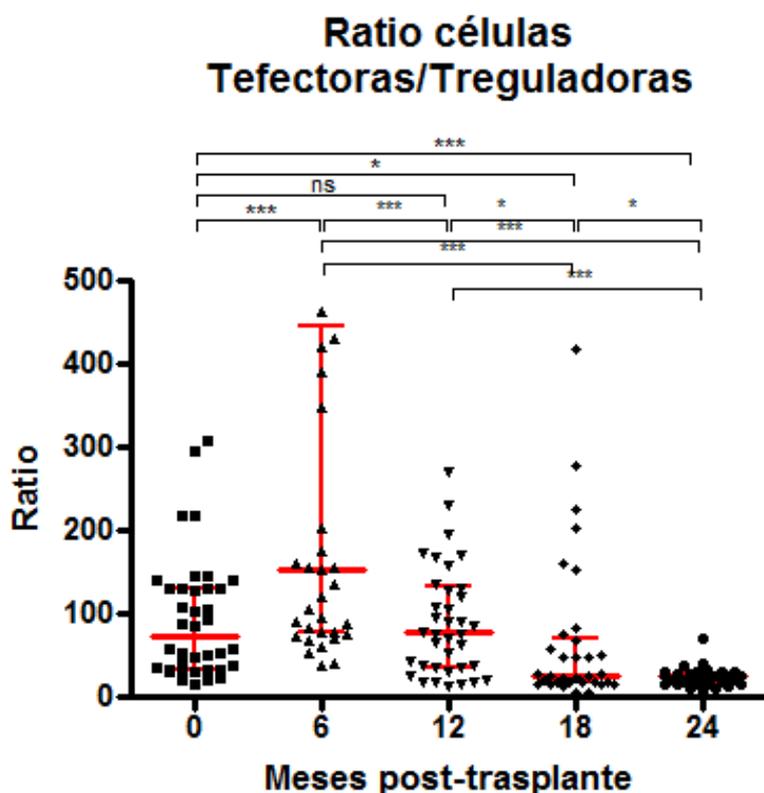


Figura 11. Evolución del ratio de células Tefectoras/Treguladoras en sangre de receptores de trasplante renal en el estudio prospectivo de dos años. Se consideraron como efectoras las células $CD4^+CD25^-$ y como reguladoras $CD4^+CD25^{high}$. Se representa la mediana y el rango intercuartílico (líneas rojas). Se indica el grado de significación estadística de la diferencia de medianas en los diferentes puntos de control, obtenido en el *test de Wilcoxon* para muestras pareadas: * ($p < 0,05$) y *** ($p < 0,001$).

5.1.2.1. Retrasplante.

Los pacientes trasplantados renales pueden sufrir un deterioro progresivo en la función del injerto causada por cambios crónicos de fibrosis intersticial y atrofia tubular con la posterior pérdida del injerto y la necesidad de ser retrasplantados. El objetivo de

este análisis ha sido evaluar el impacto de un trasplante previo y su pérdida, sobre las células linfocitarias comparado con la población de trasplantados renales que reciben un primer trasplante renal.

En la Tabla 8-Anexo I se resumen los valores de las frecuencias relativas de las subpoblaciones estudiadas. Desde el momento previo al trasplante hasta el año de seguimiento, se observa un mayor número de leucocitos en los pacientes que reciben un primer trasplante en todos los puntos de control, los valores se igualan entre ambos grupos a partir de los 18 meses post-trasplante. Como consecuencia de la leucopenia en los pacientes retrasplantados, se observa menor número de linfocitos, aunque sin diferencias significativas. En las subpoblaciones de células T, $CD4^+$ y $CD8^+$, no se observan diferencias durante el seguimiento (Tabla 9-Anexo I). Las poblaciones en las que sí se objetivan diferencias significativas son las células B ($CD19^+$) hasta el primer año de seguimiento y las células NK ($CD3^+CD16^+CD56^+$), cuyo número absoluto es superior en los pacientes con primer trasplante en ambas subpoblaciones (Tabla 9-Anexo I).

Aunque no existen diferencias significativas en la subpoblación $CD4^+$ entre ambos grupos antes del trasplante, se observa un mayor número de células Tregs $CD4^+$ en los pacientes que reciben un primer trasplante que se mantiene hasta el final del seguimiento (Figura 12 y Tabla 9-Anexo I). No se observan diferencias significativas en las células NKT ($CD3^+CD16^+CD56^+$) ni en las Tregs $CD8^+$ entre los 2 grupos.

5.1.2.2.- Necrosis tubular aguda.

El desarrollo de NTA post-trasplante conlleva un retraso en la función del injerto en los días posteriores al trasplante, que puede precisar diálisis un período variable de

días post-trasplante. La etiopatogenia de la NTA se atribuye a diversos factores inespecíficos, desde factores hemodinámicos, tubulares e inflamatorios, aunque no se descarta la implicación de células linfocitarias.

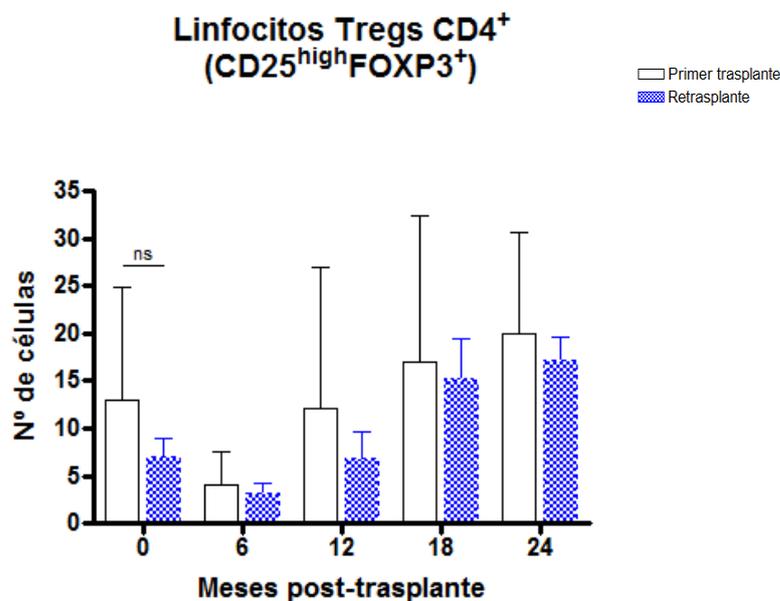


Figura 12. Efecto de retrasplante en el número de células Tregs CD4⁺ en sangre. Se compara el número absoluto de linfocitos Tregs CD4⁺ (CD25^{high}FOXP3⁺) entre pacientes con un primer trasplante (barras de color blanco, n=27) frente a los que reciben un retrasplante (barras de color azul, n=12). Las barras representan la media en ambos grupos y desviación estándar. Se indica el grado de significación estadística de la diferencia de medias en el momento previo al trasplante, en función de recibir un retrasplante o no, obtenido por el test *t* no pareado con la corrección de Welch al observar diferencia de varianzas: ns (p=0,054). En el resto de puntos de control no existe diferencia de varianzas por lo que aplicando el test *t de Student* para diferencia de medias no se observa diferencias en ningún punto de control posterior.

En la Tabla 10-Anexo I se resumen los valores de las frecuencias de las subpoblaciones circulantes en sangre estudiadas. Al comparar las subpoblaciones antes del trasplante se detecta que los pacientes que sufren NTA tienen menor número de leucocitos que los pacientes libres de patología en sangre. Esta observación se hace extensible a las subpoblaciones de linfocitos T (CD3⁺), CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ (Tabla 11-Anexo I). Un año después del trasplante, aún se mantienen las diferencias en el número de leucocitos, linfocitos, linfocitos T (CD3⁺) y CD3⁺CD4⁺ (Tabla 11-Anexo I).

Al igual que la tendencia general en el número de leucocitos, en los pacientes que desarrollan NTA se observa un descenso en el número de células T reguladoras (Figura 13).

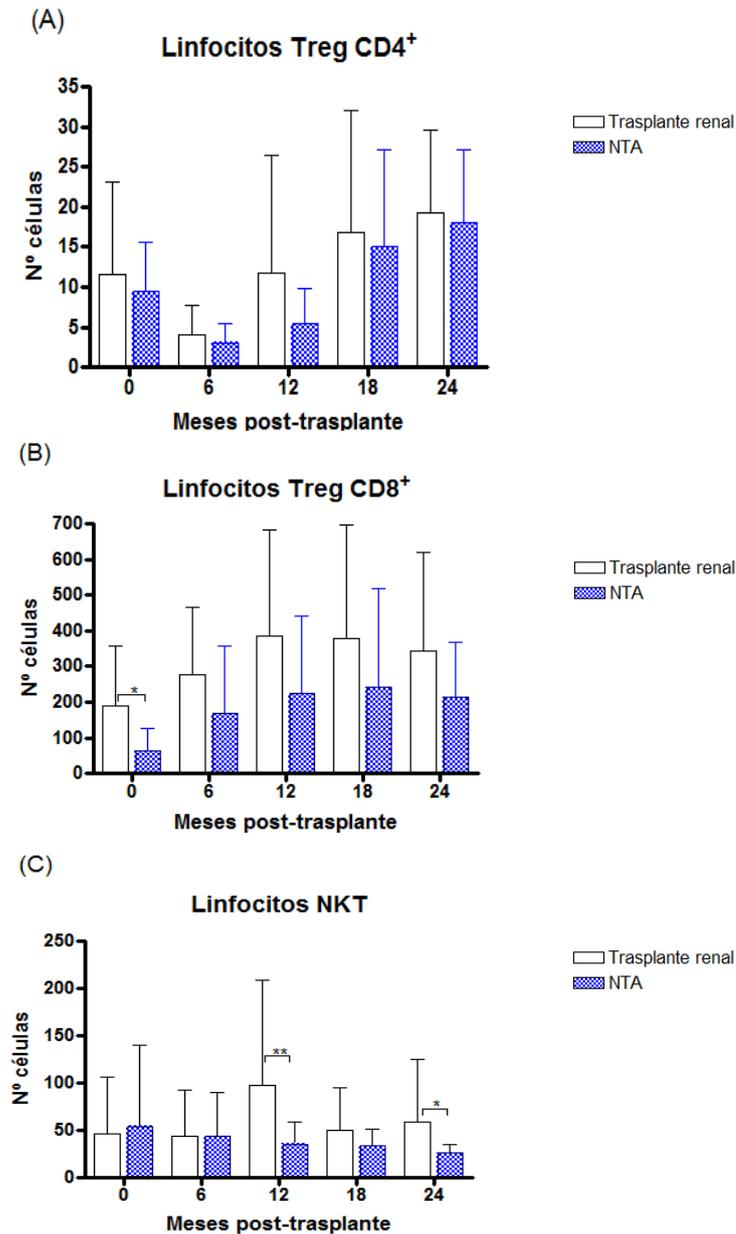


Figura 13. Efecto de la necrosis tubular aguda en el número de células reguladoras en sangre. Se compara el número absoluto de linfocitos Tregs CD4⁺ (CD25^{high}FOXP3⁺) (A); linfocitos CD8⁺ (CD28⁻) (B) y linfocitos NKT (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) entre pacientes que no desarrollan necrosis tubular aguda (NTA) (barras de color blanco, n=32) frente a los que sufren un episodio de NTA (barras de color azul, n=7). Las barras representan en ambos grupos la media y desviación estándar. Se indica el grado de significación estadística de la diferencia de medias en el momento previo al trasplante, en función de sufrir un episodio de necrosis tubular aguda o no, obtenido por el *test t Student* con la corrección de Welch cuando se observa diferencia de varianzas: ** P<0,01 y * p< 0,05. En el resto de puntos de control no existen diferencias significativas.

5.1.2.3. Rechazo agudo.

El rechazo agudo (RA), es un proceso que se presenta en pacientes trasplantados, de carácter fundamentalmente inmunológico. Todos los casos de RA en este estudio se dieron durante los primeros 6 meses post-trasplante.

En la Tabla 12-Anexo I se resumen los valores de las frecuencias relativas sanguíneas de las subpoblaciones estudiadas. No se observan diferencias significativas en el número de leucocitos en ningún punto de control. Sin embargo, tras el diagnóstico de RA a los 6 meses, se detecta un menor número de linfocitos, $CD3^+$, $CD4^+$ y $CD8^+$. Los valores medios de estas subpoblaciones se mantienen por debajo de los obtenidos en los pacientes libres de RA durante el periodo de seguimiento. Las células B ($CD19^+$) y NK ($CD3^+CD16^+CD56^+$) parecen no verse influenciadas por el hecho de sufrir un episodio de RA ya que no se observan diferencias en ningún punto de control (Tabla 13-Anexo I).

En el momento previo al trasplante no se observa ninguna diferencia significativa en ninguna subpoblación con fenotipo supresor. A los 6 meses post-trasplante, se observan diferencias en el número de Tregs $CD4^+$, aunque esta observación puede ser consecuencia de las diferencias observadas en los mismos puntos de control en la subpoblación general de $CD4^+$ (Tabla 13-Anexo I). El número absoluto de las subpoblaciones de células reguladoras ($CD4^+$ y $CD8^+$) y NKT ($CD3^+CD16^+CD56^+$) es superior en los pacientes libres de RA en todos los puntos de control posteriores al trasplante (Figura 14-Resultados).

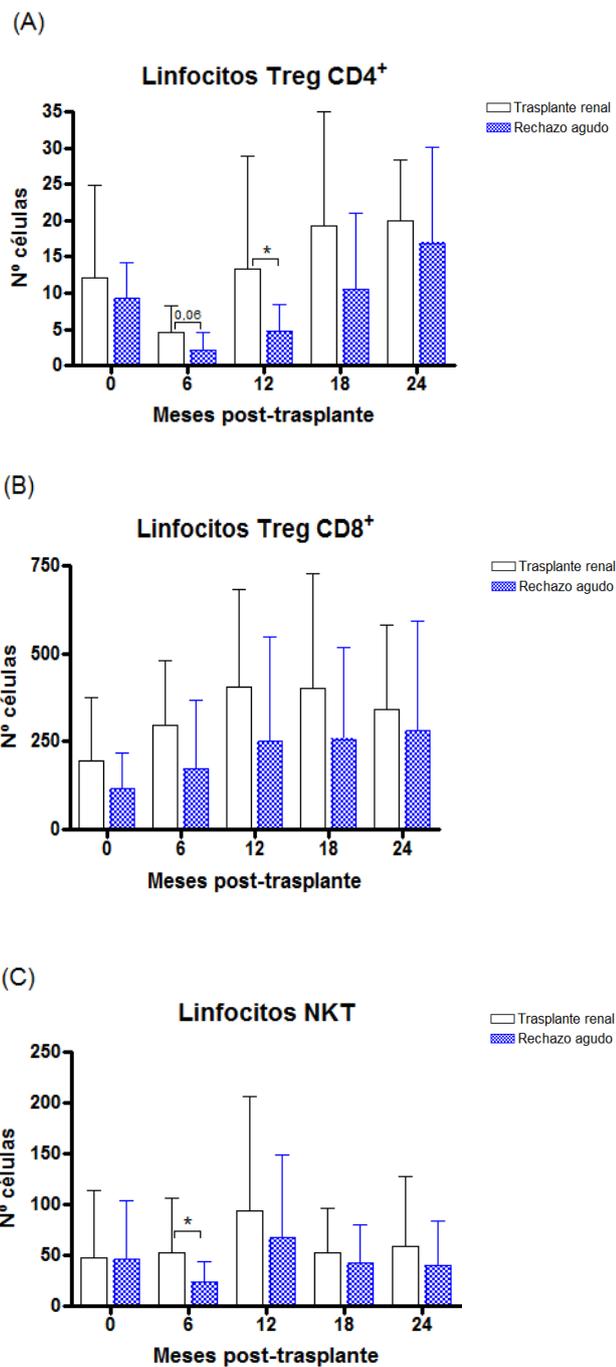


Figura 14. Comparación de las distintas subpoblaciones de células Tregs en función de la presencia de un episodio de rechazo agudo. Se midió el número de células Tregs CD4⁺ (CD25^{high}FOXP3⁺)(A), CD8⁺ (CD28⁻)(B) y NKT (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) (C) en pacientes que sufren un episodio de rechazo agudo (barras azules) y pacientes trasplantados libres de rechazo (barras blancas). Cada barra representa la media y desviación estándar en cada grupo. Se indica el grado de significación estadística de la diferencia de medias, aplicando la corrección de Welch cuando se observa diferencia de varianzas, en cada punto de control entre los pacientes libres de rechazo (n=26) y los que presentaron un episodio de rechazo agudo (n=12), obtenido en el test *t de Student*: * (p<0,05)

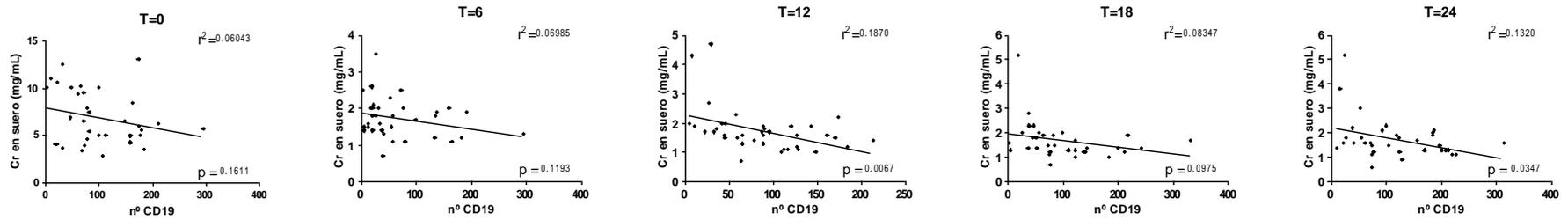
5.1.3. Comparación de las subpoblaciones linfocitarias en pacientes trasplantados renales según la función del injerto.

Para evaluar la función renal del paciente trasplantado, se ha utilizado la ecuación MDRD-4 (descrita en material y métodos) [213].

Ante la dificultad de establecer un punto de corte fiable para la FG con el objeto de diferenciar mejor o peor función renal, hemos realizado correlaciones entre los niveles de subpoblaciones linfocitarias y marcadores de función renal. Dentro de las subpoblaciones linfocitarias generales, se observa una correlación positiva entre el número de células B (CD19⁺) y la función renal (Figura 15A).

Así como sí se ha adscrito una función tolerogénica a las células Tregs, no está claro y existe un amplio debate acerca de su posible papel como biomarcador predictor de la función renal en trasplante. En el estudio prospectivo a 2 años no se observó ninguna asociación entre creatinina (Cr) sérica o filtrado glomerular y el número de células Tregs CD4⁺ aplicando el test de rangos de Spearman, realizado en cada punto de control. Sin embargo, cuando analizamos la evolución temporal a los dos años aplicando un test ANOVA de medidas repetidas, donde el número de células Tregs CD4⁺ en cada momento del estudio fue evaluado de acuerdo con el filtrado glomerular como variable independiente, se encontró que la mejoría del filtrado glomerular se acompañó de un aumento del número de células Tregs en cada punto de análisis (Figura 16). Además el número de células Tregs a los 2 años de seguimiento fue significativamente mayor ($p=0,035$) en el grupo de pacientes con mejor función renal ($FG > 60\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$). La única subpoblación con función reguladora asociada a función renal es la NKT (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) en la que se ha observado una correlación positiva a lo largo del seguimiento (Figura 15B).

A)



B)

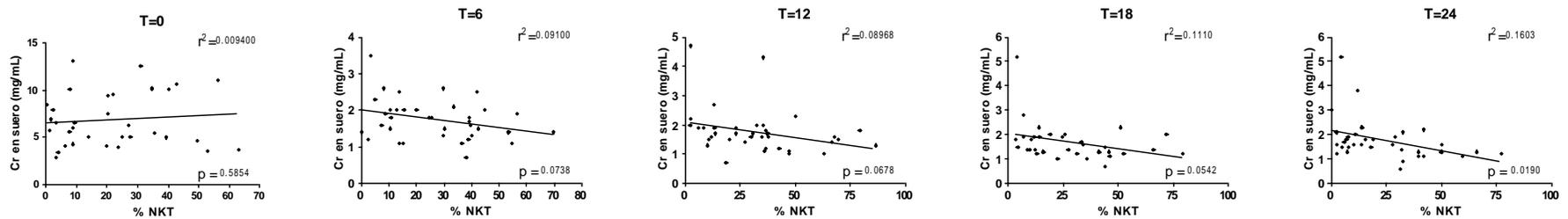


Figura 15. Correlación entre función del injerto renal y subpoblaciones celulares. Se estudió la asociación entre la creatinina (Cr) en suero como parámetro de función renal y el número de células B (CD19⁺: A) así como la frecuencia relativa de células NKT (CD3⁺CD16⁺CD56⁺: B) en cada uno de los puntos de seguimiento, pre-trasplante (T=0) y cada 6 meses post-trasplante (T=6, T=12, T=18 y T=24). Se indica el grado de significación entre las variables, obtenido con el test de correlación de Spearman.

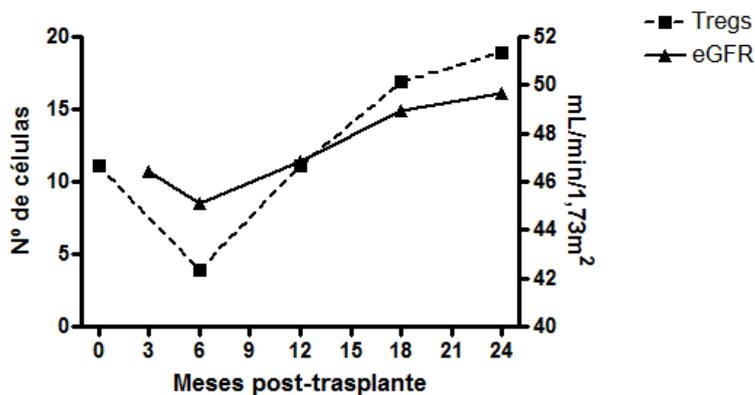
Células Treg CD4⁺ y Filtración Glomerular

Figura 16. Asociación entre el número de células Tregs CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ y la filtración glomerular estimada (eGFR) durante el seguimiento de los pacientes. Se observó una significación estadística ($p=0,035$) entre el aumento en el número de células Tregs desde el trasplante y la eGFR a los 2 años de seguimiento, calculado en un modelo lineal general.

5.1.4. Comparación de las subpoblaciones linfocitarias en pacientes trasplantados renales según el régimen inmunosupresor.

El abordaje terapéutico del paciente trasplantado es variado y complejo. El clínico debe tener en cuenta diversos aspectos previos al trasplante, como tipo de donante y condiciones previas del receptor (primer trasplante, nivel de sensibilización del paciente, histocompatibilidad, entre otras). En función de estas variables se establece un tratamiento inmunosupresor peri-trasplante (denominada terapia de inducción) y, posteriormente, valorando factores importantes como función del injerto, nefrotoxicidad se decide y/o modifica el tratamiento posterior (tratamiento de mantenimiento). Debido a la influencia que los diferentes regímenes inmunosupresores pueden tener sobre las diferentes subpoblaciones con función reguladora, se decidió estudiar por separado el papel de la terapia de inducción y de mantenimiento.

5.1.4.1. Tratamiento de inducción:

Dependiendo del riesgo inmunológico, los pacientes recibieron o no terapia de inducción, en el presente estudio, se aplicaron dos terapias distintas de inducción, una con timoglobulina (TG) y la otra con anti-CD25. Un 5,13% de los pacientes recibió TG, un 28,2 % anti-CD25 y el 66,67% restante no fue tratado con terapia de inducción. La Tabla 14-Anexo I resume las características demográficas, clínicas e inmunológicas de cada grupo de pacientes.

La edad del donante y del receptor fue mayor en los pacientes que recibieron tratamiento de inducción al considerarse de mayor riesgo. No se han podido realizar contrastes estadísticos a largo plazo de los pacientes tratados con TG debido a su escaso número, por lo que se decidió comparar los pacientes que recibieron anti-CD25 y los trasplantados sin terapia de inducción (Tablas 15 y 16-Anexo I). Al evaluar el impacto del tratamiento de inducción con anti-CD25 sobre las poblaciones linfocitarias caracterizadas con este marcador, entre ellas, las células Tregs CD4⁺. A los seis meses post-trasplante, de forma contraria a lo observado en los pacientes sin tratamiento de inducción, se observó un aumento en los niveles de células Tregs CD4⁺ (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) (Figura 17). Sin embargo, al año del trasplante los pacientes sin inducción recuperan los niveles de Tregs, mientras que los pacientes tratados con anti-CD25 no recuperan los niveles de Tregs pre-trasplante hasta los 18 meses.

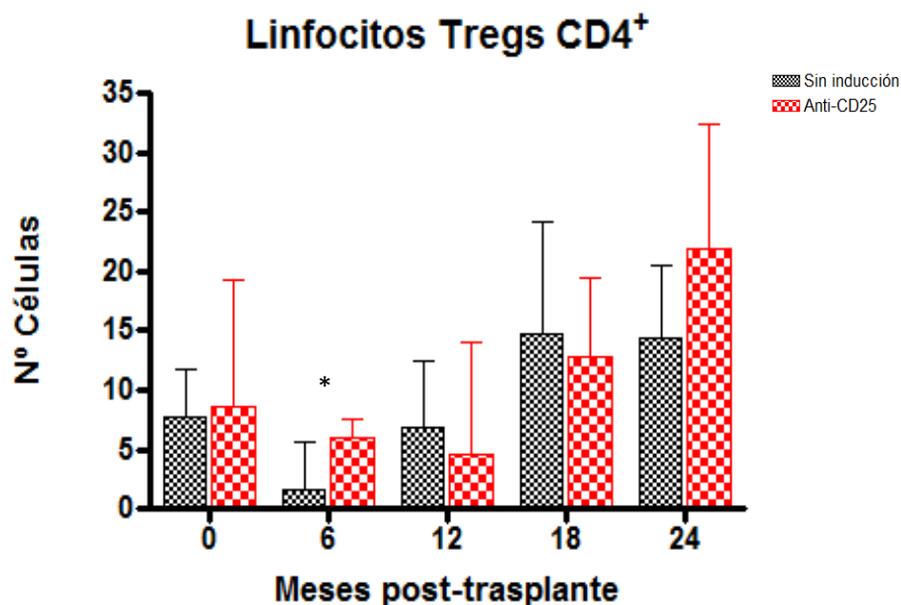


Figura 17. Impacto del tratamiento de inducción en la población de células Tregs CD4⁺. Se midieron los niveles de células Tregs CD4⁺ (CD25^{high}FOXP3⁺) entre pacientes trasplantados renales tratados con terapia de inducción con anti-CD25 (barras rojas, n=11) y sin terapia de inducción (barras negras, n=26). Las barras representan la mediana de los valores de células Tregs CD4⁺ en cada punto de control y el rango intercuartílico. Se indica el grado de significación estadística de la diferencia de las medianas entre ambos grupos, obtenido en el test *de Wilcoxon*. * (P<0,05); en el resto de puntos de control la p no es significativa.

5.1.4.2. Efecto del tratamiento de mantenimiento sobre las subpoblaciones linfocitarias

Para evaluar el efecto de los fármacos utilizados en la terapia de mantenimiento en pacientes con trasplante renal, los pacientes se dividen habitualmente en función de las dianas moleculares de su tratamiento: los inhibidores de la calcineurina (CNI), ciclosporina y tacrolimus, frente a los inhibidores de mTOR (imTOR), Rapa y everolimus. Dichas dianas, al encontrarse en diferentes puntos en la cascada de activación linfocitaria, podrían tener diferentes efectos sobre las subpoblaciones circulantes (Figura 18).

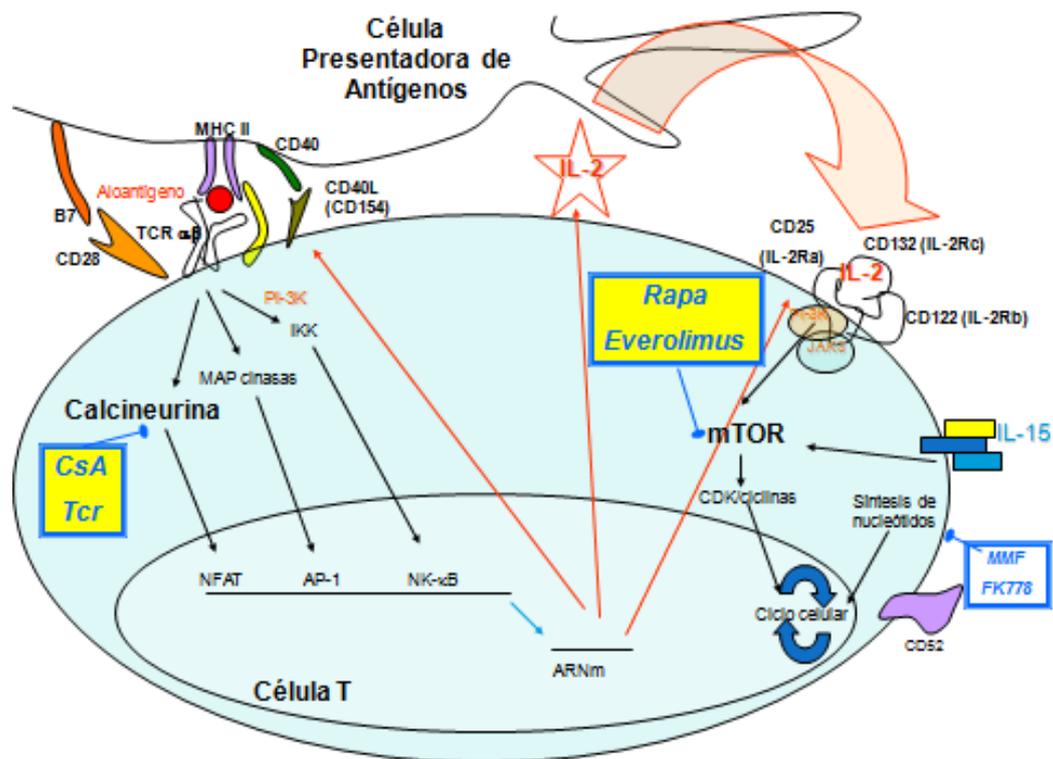


Figura 18. Esquema de los diferentes fármacos inmunosupresores y sus dianas en las diferentes vías de señalización tras activación de la alorespuesta inmunitaria. Cuando se realiza una presentación efectiva del aloantígeno se activan varias cascadas intracelulares, entre ellas la de la calcineurina, diana de la ciclosporina (CsA) y tacrolimus (Tac). Estas cascadas desembocan en la síntesis de moléculas coestimuladoras, interleucinas y subunidades proteicas de receptores de interleucinas. La interleucina 2 producida puede tener un efecto autocrino y tras unirse a su receptor de alta afinidad, activa la vía de mTOR, diana de la rapamicina, que estimula la entrada en ciclo celular y la consiguiente proliferación celular.

Una limitación de este análisis fue el bajo número de pacientes con imTOR en todos los puntos de control (tres pacientes al año, año y medio y dos años post-trasplante), por lo que al analizar los números absolutos de las subpoblaciones linfocitarias, no se encuentran diferencias significativas entre los pacientes tratados con CNI y Rapa en cada punto de control (Tabla 17-Anexo I).

Analizamos separadamente los 3 pacientes que fueron tratados con RAPA desde el primer año de seguimiento y no observamos diferencias en el número de células Tregs $CD4^+$ (Figura 19). Sin embargo, observamos que la mediana de las células NKT en los tratados con Rapa era más elevada que los tratados con CNI (Figura 20).

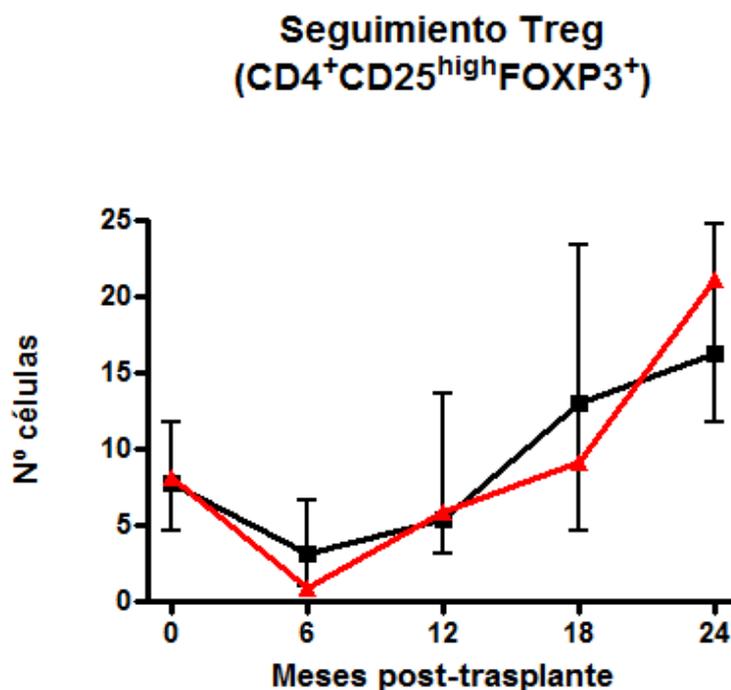


Figura 19. Efecto de la terapia de mantenimiento sobre las células Tregs $CD4^+$ ($CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$) en pacientes trasplantados renales. Se compararon los niveles absolutos de células Tregs $CD4^+$ a partir del año post-trasplante en pacientes tratados con triple terapia, esteroides, mofetil micofenolato y tacrolimus ($n=30$, línea negra) y pacientes tratados con Rapa ($n=3$, línea roja) durante el último año de seguimiento. Los cuadrados negros (triple terapia) y triángulos rojos (Rapa) indican la mediana en cada grupo y punto de control, además se refleja el rango intercuartílico en el grupo de pacientes bajo triple terapia. No se observaron diferencias significativas entre las medianas de ambos grupos, aplicando el test *U de Mann-Whitney*.

5.1.4.2.1.-Efecto del tratamiento de mantenimiento sobre las subpoblaciones linfocitarias con fenotipo regulador. Influencia de la carga inmunosupresora.

Al observar que ciertas poblaciones reguladoras se vieron afectadas por los diferentes tratamientos, se decidió profundizar en el estudio de la inmunosupresión

mayoritaria utilizada en la cohorte prospectiva (tacrolimus) y se valoró el efecto que podría causar la carga de inmunosupresión sobre la función supresora de las células Tregs.

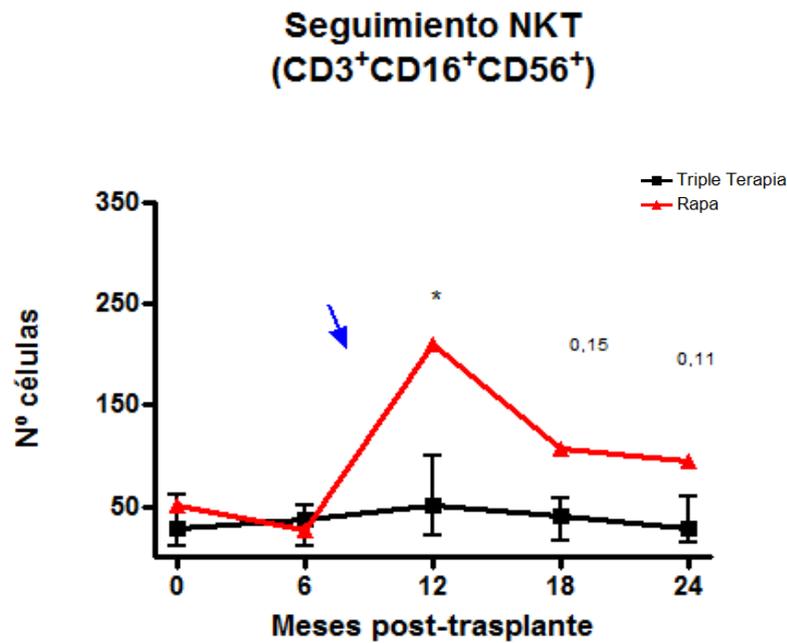


Figura 20. Efecto de la terapia de mantenimiento sobre las células NKT (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) en pacientes trasplantados renales. Se compararon los niveles absolutos de células NKT a partir del año post-trasplante en pacientes tratados con triple terapia, esteroides, mofetil micofenolato y tacrolimus (n=30, línea negra) y pacientes tratados con Rapa (n=3, línea roja) durante el último año de seguimiento. Los cuadrados negros (CNI) y triángulos rojos (Rapa) indican la mediana en cada grupo y punto de control, además se refleja el rango intercuartílico en el grupo de pacientes bajo triple terapia. Se muestra el grado de significación estadística de la diferencia de las medianas entre ambos grupos, obtenido en el test *U de Mann-Whitney*: * (p<0,05).

Para ello, se establecieron tres grupos en función de la carga de Tac en cada uno de los puntos de control. Para efectuar los distintos grupos, se tomó como referencia las frecuencias de distribución en cada punto de control dado que a medida que avanza el seguimiento, se reduce la carga de Tac. Los puntos de corte en cada punto de control se reflejan en la Figura 21.

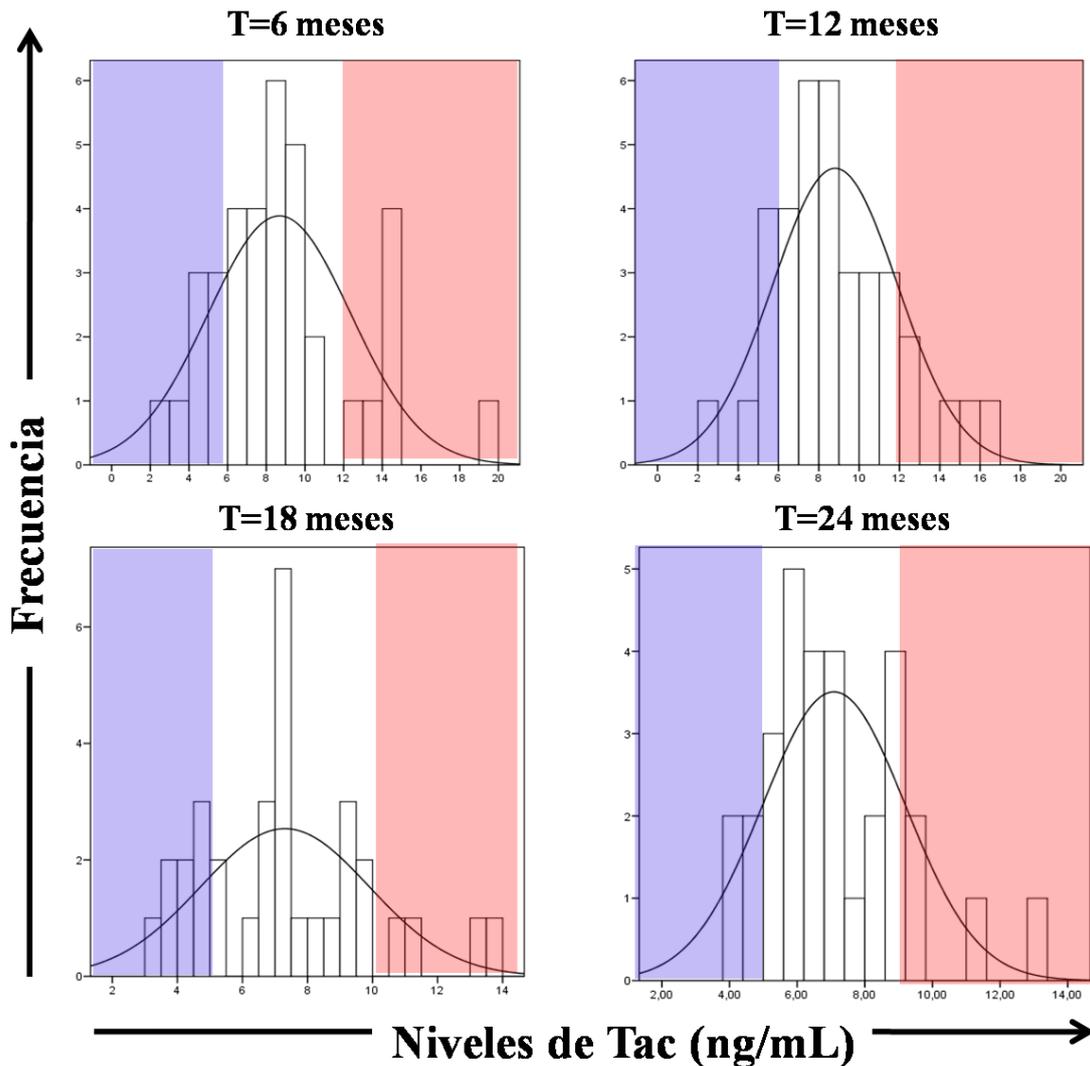


Figura 21. Distribución de los niveles de Tacrolimus (Tac) en los diferentes puntos de control estudiados. Se establecieron diferentes valores de referencia de los niveles de Tac en los diferentes puntos de control, basándose en la frecuencia de distribución en cada punto. Se definió en cada punto de control tres estados, uno de baja carga de Tac (sombreado en color azul), carga intermedia (sin color) y de elevada carga de Tac (sombreado de color rojo). Los límites inferiores fueron 6 ng/mL a los 6 y 12 meses y 5 ng/mL a los 18 y 24 meses. Los límites superiores fueron 12 ng/mL a los 6 y 12 meses, 10 ng/mL a los 18 meses y 9 ng/mL a los 24 meses.

Los pacientes con niveles elevados de Tac presentan menor número de células Tregs CD4⁺ a los seis meses de seguimiento ($p=0,0428$) con respecto al grupo de pacientes con niveles bajos de Tac. De la misma manera, la diferencia entre ambos grupos, a los 18 meses incluso se hace más patente ($p=0,0065$). A los dos años de

seguimiento parece que los niveles de células reguladoras se mantienen sin cambios entre ambos grupos (Figura 22).

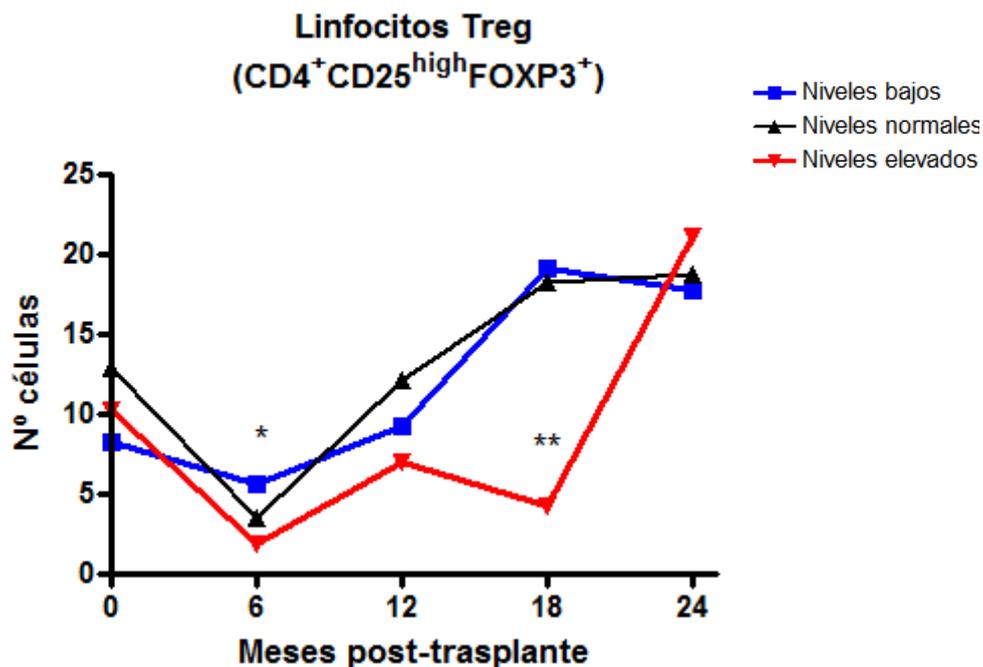


Figura 22. Impacto de los niveles de Tac en los niveles de células T CD4⁺ reguladoras de pacientes trasplantados renales. Se establecieron tres grupos de pacientes en función de la carga de Tacrolimus (Tac) (véase la figura 20), con niveles bajos de Tac (línea azul, n en cada punto de control: 8, 6, 8 y 4), niveles intermedios (línea negra, n en cada punto de control: 19, 24, 20 y 22) y niveles elevados de Tac (línea roja, n en cada punto de control: 7, 5, 4 y 4) y se comparó el seguimiento de las células T CD4⁺ reguladoras entre los grupos hasta los 2 años. Se indica el grado de significación estadística de la diferencia de medias entre los grupos en función de los niveles de Tac en cada punto de control, obtenido en el test *t de Student*: * ($p < 0,05$) y ** ($p < 0,01$).

Confirmado el efecto deletéreo de los niveles sanguíneos elevados de Tac sobre las células Tregs, a continuación se estudió el impacto que podrían tener los CNI sobre la función supresora de las células Tregs CD4⁺, mediante cultivo mixto linfocitario (descrito en material y métodos). Al estimular células efectoras del receptor con esplenocitos específicos del donante, se observó una proliferación controlada por las células Tregs CD4⁺ del receptor. Interesantemente se comprobó una correlación

negativa entre los niveles de Tac y la función reguladora de las células Tregs CD4⁺ en todos los puntos de control (Figura 23).

En resumen, los niveles elevados de Tac no sólo tienen un efecto deletéreo en el número de células Tregs sino que, más importante aún, afectan a su función reguladora *in vitro* (Figura 23).

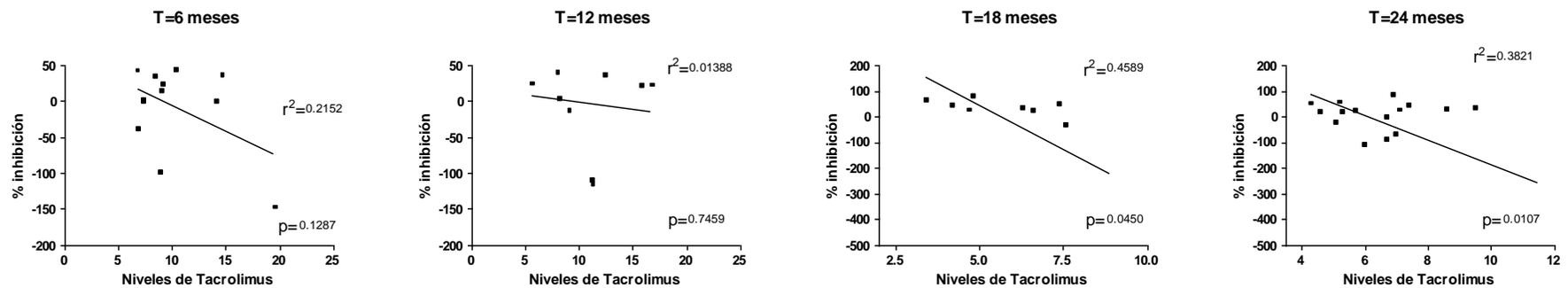


Figura 23. Impacto de los niveles de Tacrolimus sobre la función de las células Tregs CD4⁺. La función de las células Tregs CD4⁺ se testó en cultivos mixtos linfocitarios, y se expresó en porcentaje de inhibición de la proliferación de células T CD4⁺ efectoras (Material y métodos). Se indica el grado de significación estadística de la correlación entre los niveles de Tac y el porcentaje de inhibición en cada punto de control, obtenido en el test *de correlación de Spearman*: * ($p < 0,05$).

5.2. BLOQUE II: Estudio Retrospectivo

Dado que el estudio prospectivo reclutó a un número reducido de pacientes tratados con imTOR (Rapa o Evelolimus), se optó por hacer una comparación de manera retrospectiva en trasplantados renales históricos (con más de un año de seguimiento) con diferente tratamiento de mantenimiento.

Se utilizaron dos grupos control para el análisis fenotípico: un grupo consistió en 20 donantes sanos (D) y el otro grupo consistió en 25 pacientes con enfermedad renal terminal (ERT) en el momento del trasplante. Las muestras de sangre de estos dos grupos fueron recogidas durante los años 2004 y 2005. El grupo de ERT fue escogido como grupo control de enfermedad renal dado que ellos no recibieron inmunosupresión previa.

La Tabla 3 muestra las características clínicas, demográficas e inmunológicas de los pacientes tratados con Rapa y CNI así como las de los pacientes con ERT y D. Los pacientes con trasplante renal funcionante tratados con CNI fueron emparejados con pacientes tratados con Rapa con el mismo periodo de evolución del trasplante. No se encontró ninguna diferencia significativa en ningún factor de alosensibilización entre ambos grupos. Por lo tanto, se considera que ambos eran similares en términos de factores de riesgo inmunológico. En el grupo de pacientes tratados con Rapa, hubo una mayor frecuencia de etiología glomerular como causa del fallo renal comparado con el grupo tratado con CNI, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Ninguno de los pacientes trasplantados renales tratados con Rapa sufrió una recaída de la glomerulonefritis primaria.

5.2.1. Frecuencia y caracterización de las células reguladoras en receptores de aloinjerto renal: diferencia entre los pacientes tratados con RAPA y CNI.

La mediana del porcentaje de células T $CD4^+CD25^+$ fue significativamente inferior en el grupo de pacientes que recibieron CNI cuando se comparó con el grupo de pacientes que recibieron Rapa en el momento del estudio (Figura 24). Además, cuando se consideró la frecuencia de las células $CD4^+CD25^{high}$ entre el total de PBMCs, el descenso de estas células en el grupo CNI comparado con el grupo Rapa fue también significativo (Figura 24). Cuando se observaron los resultados de los grupos control, los sujetos de los grupos D y ERT, mostraron porcentajes de células T $CD4^+CD25^+$ y $CD4^+CD25^{high}$ equivalentes al grupo Rapa (Figura 24).

Además, analizamos la expresión de las moléculas HLA-DR y CD38 sobre las células T $CD4^+CD25^+$ para descartar la posibilidad de que estas células fuesen células T $CD4^+$ efectoras recientemente activadas. Se observó una ausencia de expresión tanto de HLA-DR como de CD38 sobre las células T $CD4^+CD25^+$ en los dos grupos de receptores de trasplante renal estudiado. Los porcentajes de células T $CD4^+CD25^+$ que expresan GITR en el grupo CNI fue mayor que en el grupo Rapa, aunque no se observaron diferencias significativas. Los grupos D y ERT también mostraron frecuencias más bajas, aunque no significativas, que el grupo CNI (Tabla 18).

La naturaleza reguladora de las células T $CD4^+CD25^{high}$ está apoyada por la expresión de FOXP3. Todas las células $CD4^+CD25^{high}$ de ambos grupos de pacientes trasplantados renales expresaron FOXP3, a diferencia de las células $CD4^+CD25^-$ o $CD4^+CD25^{low}$ que expresaron menos de un 20% de FOXP3. Además no se observó ninguna diferencia cuantitativa en la expresión de FOXP3 en ambos grupos, medida como la media de intensidad de fluorescencia (Figura 25). Algunos estudios han

encontrado que la expresión de FOXP3 en las células T CD8⁺ poseían características supresoras. Sin embargo, ambos grupos de pacientes trasplantados renales no mostraron expresión de FOXP3 en células T CD8⁺.

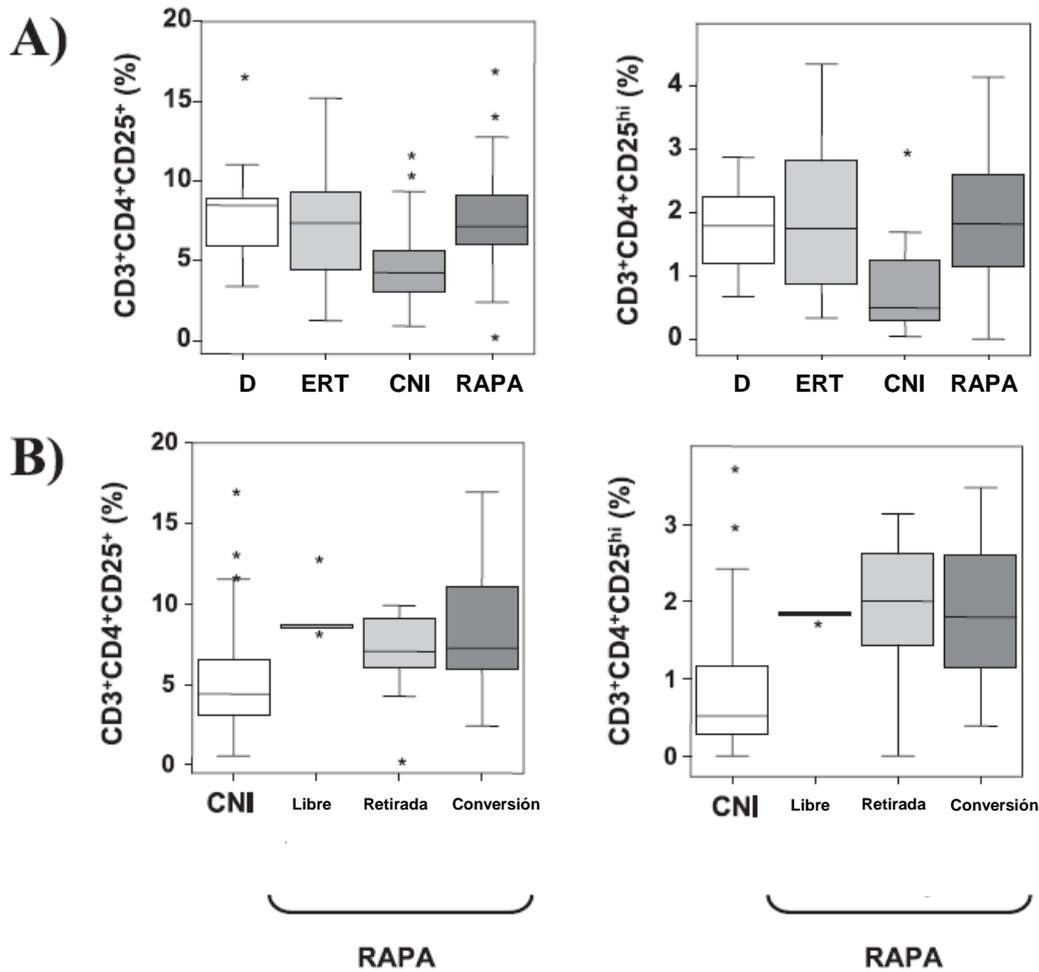


Figura 24. (A) Cuantificación de células Tregs CD4⁺ en sangre de pacientes trasplantados renales. Se compararon las frecuencias relativas en sangre de las células T CD4⁺CD25⁺ y de las CD4⁺CD25^{high} en pacientes con trasplante renal que recibieron como terapia de mantenimiento RAPA durante al menos un año previo al análisis frente a los que recibieron CNI. Los donantes sanos (D) y los pacientes con enfermedad renal terminal (ERT) se utilizaron como controles. Se muestra la mediana y los percentiles 3, 25, 75 y 97. Las diferencias estadísticamente significativas en células T CD4⁺CD25⁺ fueron: pacientes tratados con CNI y RAPA (P=0,002), D (P=0,001) y ERT (P=0,018). Las diferencias estadísticamente significativas en células T CD4⁺CD25^{high} fueron: pacientes tratados con CNI y RAPA (P<0,001), DS (P<0,001) y ERT (P=0,001). (B) Comparación de las frecuencias relativas sanguíneas de células T CD4⁺CD25⁺ y de células T CD4⁺CD25^{high} en los pacientes tratados con CNI y los distintos grupos de pacientes tratados con RAPA. El primer grupo de pacientes tratado con RAPA desde el trasplante a los cuales no se les administró nunca CNI (Libre CNI, n=5), un segundo grupo tratado con CNI y RAPA desde el trasplante y a los que se les retiró el CNI (Retirada CNI, n=11) y un tercer subgrupo tratado con CNI desde el trasplante pero posteriormente fue sustituido por RAPA (Conversión CNI, n=16). Las diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia relativa de células T CD4⁺CD25⁺ fueron: entre los grupos tratados con CNI y libres de CNI (P=0,011), retirada de CNI (P=0,059) y conversión de CNI (P=0,003). Las diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia relativa de células T CD4⁺CD25^{high} fueron: entre los grupos tratados con CNI y libres CNI (P<0,001), retirada de CNI (P=0,007) y conversión de CNI (P<0,001).

Tabla 18. Comparación de la frecuencia de células T CD4⁺CD25⁺GITR⁺ en sangre entre pacientes con trasplante renal que reciben inhibidores de la calcineurina (CNI) y tratados con Rapa.

	%CD4 ⁺ CD25 ⁺ GITR ⁺	Valor de P
Inhibidores de la calcineurina	3,72 (0,47-15,05)	
Rapamicina	1,52 (0,23-58,47)	ns
- Libres de CNI	1,66 (0,67-12,69)	ns
- Retirada de CNI	1,37 (0,18-15,56)	0,03
- Conversión de CNI	1,88 (0,25-99,41)	ns
Enfermedad renal terminal	2,45 (0,38-9,25)	ns
Donantes sanos	1,07 (0,30-1,92)	0,01

Se representa la mediana y 5% y 95% percentiles (en paréntesis)

El grupo de Rapa se dividió en tres subgrupos adicionales: un primer subgrupo tratado con Rapa desde el tiempo del trasplante y que nunca ha recibido CNI (Libres de CNI), un segundo subgrupo tratado con Rapa y CNI desde el trasplante en el que se retira los CNI (Retirada de CNI) y un tercer subgrupo tratado con CNI desde el tiempo del trasplante y que posteriormente se sustituyó por Rapa (Conversión de CNI). Se indican las diferencias significativas entre los grupos tratados con CNI y los diferentes subgrupos tratados con Rapa calculadas mediante el test *U de Mann-Whitney*.

Además, no se encuentran diferencias significativas en las frecuencias de células T CD8⁺CD28⁻, los cuales son consideradas como otra subpoblación de células reguladoras [216-217], entre los dos grupos de pacientes tratados tanto con Rapa y con CNI (mediana [percentiles 5%-95%]): 50,29 [11,24-74,50] y 60,82 [18,97-79,43].

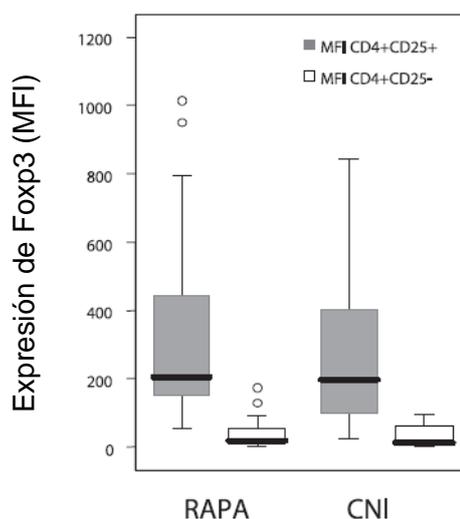


Figura 25. La expresión de FOXP3 en las células T CD4⁺CD25⁺ reguladoras, medida en intensidad media de fluorescencia mediante citometría de flujo, fue similar en ambos grupos de receptores de trasplante renal tratados con Rapa y con CNI. La expresión de FOXP3 en las células CD4⁺CD25⁺ (barras de color gris) fue ocho veces más elevada ($P < 0,001$) que en las células T reguladoras CD4⁺CD25⁻ (barras de color blanco).

Para establecer si el efecto observado en los receptores de trasplante renal tratados con Rapa estaba sesgado por una terapia inicial post-trasplante con CNI y un cambio posterior a Rapa, dividimos el grupo descrito como Rapa en tres subgrupos adicionales, libre de CNI, retirada de CNI y conversión de CNI. Las frecuencias de células T $CD3^+CD4^+CD25^+$ y $CD3^+CD4^+CD25^{high}$, fueron significativamente superiores en los tres subgrupos de Rapa comparado con el grupo CNI (Figura 24B). Cuando comparamos las frecuencias de $CD3^+CD4^+CD25^+$ y $CD3^+CD4^+CD25^{high}$ entre los tres subgrupos Rapa, no se observó ninguna diferencia. Se observaron resultados equivalentes para la expresión de GITR (Tabla 18). Por lo tanto, la terapia inicial con CNI no parece alterar el efecto encontrado en el grupo total Rapa.

5.2.2. Función reguladora de las células T $CD4^+$ en reacción mixta linfocitaria.

Debido a que todos los marcadores de superficie que definen la subpoblación de células reguladoras en humanos, incluyendo FOXP3, también pueden ser observados en células T activadas, se quiso evaluar la capacidad natural de las células Tregs $CD4^+CD25^{high}$ mediante estudios funcionales *in vitro*. Para este propósito, analizamos el efecto de células T $CD4^+CD25^{high}$ seleccionadas mediante FACS sorting en cultivos primarios linfocitarios entre células T $CD4^+CD25^-$ seleccionadas mediante FACS como células respondedoras y esplenocitos del donante como células estimuladoras. Como se muestra en la Figura 26, la adición de células T $CD4^+CD25^{high}$ del receptor al cultivo mixto resultó en una inhibición de la proliferación de un 25-44% de las células T $CD4^+CD25^-$ a un ratio 1/0.625 ($CD4^+CD25^-/CD4^+CD25^{high}$).

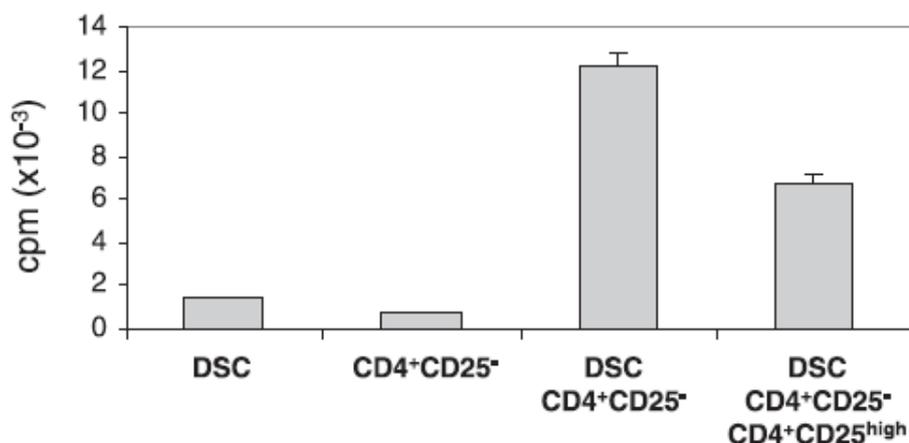


Figura 26. Función reguladora de las células CD4⁺CD25^{high} en cultivo mixto linfocitario. Se cultivaron células del huésped efectoras CD4⁺CD25⁻ solas o junto a células T reguladoras CD4⁺CD25^{high} en presencia de esplenocitos del donante (DSC) como fuente de aloantígenos.

5.2.3. Relación entre las frecuencias de células T reguladoras en pacientes tratados con CNI y RAPA y función renal.

Con el objeto de establecer un beneficio potencial en la conservación de los números de células reguladoras en sangre en pacientes tratados con Rapa en términos de función renal, analizamos el Δ FG (véase material y métodos) en la población a estudio de acuerdo con su tipo de inmunosupresión (Tabla 19). La Δ FG aumenta significativamente en el grupo de pacientes libres de CNI y en el grupo retirada de CNI comparado con el grupo CNI desde el momento del trasplante (Tabla 19).

El Δ FG mostró una correlación muy pobre con las frecuencias de células T reguladoras en los grupos RAPA o CNI y nunca se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas (coeficientes de correlación de Spearman entre el porcentaje de células CD3⁺CD4⁺CD25^{high} y Δ FG: 0,103 en el grupo RAPA vs 0,053 en el grupo CNI). Entonces, parece que el mantenimiento del número de células Tregs no

está acompañado por una mejor función renal a largo plazo, aunque el tamaño muestral fue demasiado pequeño para proporcionar resultados significativos.

Tabla 20. Función renal en los pacientes estudiados de acuerdo a su régimen inmunosupresor

Régimen inmunosupresor (meses de seguimiento)	FG en el primer mes post-trasplante (mL/min/1,73m ²)	FG actual (mL/min/1,73m ²)	ΔFG (mL/min/1,73m ² por mes)	Valor de p
CNI (47±21)	51 (10,2-85,3)	45,6 (14,5-62)	-0,13 (-0,74 a 0,33)	
Grupo Rapamicina				
- Libre de CNI (23,7±5,9)	29,5 (16,7-42,3)	56,8 (15,8-94,6)	0,91 (-0,05 a 2,14)	0,004
- Retirada de CNI (63±22) ^a	46,5 (11,8-65)	56,1 (12,6-87,1)	0,22 (-0,12 a 0,60)	0,003
- Conversión de CNI (65±25) ^b	47,13 (15,3-65,2)	47,8 (13,1-73)	0,05 (-0,3 a 0,57)	NS

Se utilizó la ecuación simplificada MDRD para estimar la Filtración glomerular. Los datos se expresan como media±desviación estándar o mediana (percentiles 5% y 95%).

ΔFG=(FG actual-FG en el primer mes post-trasplante)/meses de seguimiento

^aMeses desde la retirada de CNI: 44±25. Estos pacientes empezaron con CNI y Rapa, posteriormente se retiró el tratamiento de CNI continuando únicamente con Rapa.

^bmeses desde la conversión: 26±15. Estos pacientes comenzaron con tratamiento basado en CNI sin Rapa y posteriormente se convirtieron a una terapia exclusiva con Rapa.

CNI, inhibidores de la calcineurina; Rapa, rapamicina.

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

En los últimos años se han publicado muchas evidencias a favor del efecto de las células Tregs en la inducción de alotolerancia [218-221]. Sin embargo, la gran mayoría proceden de modelos animales murinos o de estudios clínicos retrospectivos con cohortes bien definidas [222]. El estudio prospectivo de este trabajo es uno de los primeros en el que se evalúa, de forma seriada, los cambios de las diferentes subpoblaciones de células Tregs en sangre de pacientes trasplantados renales desde el momento previo al trasplante hasta los dos primeros años de seguimiento.

Las células Tregs han sido materia de especial atención en los mecanismos de tolerancia al injerto [72]. Desde sus primeras descripciones, los marcadores de superficie celular que ayudan a definir estas células se han revisado continuamente [223]. En el presente estudio, hemos utilizado la mayoría de los marcadores mejor establecidos desde el comienzo del trabajo, tales como CD4, CD25, GITR, CD62L, CD45RA⁻, para los experimentos de caracterización inmunofenotípica así como de clasificación y aislamiento para cultivo [223]. Además, estudiamos la expresión del factor de transcripción FOXP3 que se ha considerado el gen más importante en la caracterización de las células Tregs naturales. Independientemente del marcador utilizado para clasificar a las células Tregs, la prueba definitiva de su capacidad reguladora debe ser ratificada en cultivos *in vitro*. En este trabajo hemos definido fenotípicamente a las células Tregs como CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺, y se ha confirmado la capacidad supresora de las células Tregs CD4⁺ *in vitro*.

En el momento del trasplante, los receptores del injerto renal presentaron números similares de células Tregs circulantes que los donantes sanos, excepto aquellos receptores de un retrasplante que presentaban niveles inferiores (Figura 12).

Posteriormente las diferencias entre pacientes retrasplantados y con primer trasplante desaparecieron. Esta observación se puede explicar por la alorespuesta inducida por un trasplante previo que probablemente favorezca la inducción de células T_H17 y un descenso en células Tregs [224]. Esta hipótesis se mantiene por nuestras observaciones de menor número de células Tregs en aquellos pacientes que sufren un rechazo agudo. Como se ha descrito anteriormente por Veronese y colaboradores [225], las células $FOXP3^+$, la mayoría $CD4^+$, infiltran el injerto durante un episodio de rechazo agudo celular, siendo preferencialmente localizadas en los túbulos. Tal infiltración apunta a su papel potencial inmunoregulador contra una alorespuesta en curso frente al injerto. El descenso de Tregs observado en los receptores que rechazan comparado con los trasplantados libres de rechazo a partir del sexto mes post-trasplante puede ser explicada por una extravasación de las células Tregs desde los vasos sanguíneos hasta el injerto. Dicha infiltración puede durar hasta el segundo año de seguimiento ya que se observan diferencias entre ambos grupos de trasplantados renales hasta en este punto de control. Desafortunadamente no hemos podido tener acceso a las biopsias para analizar si existe dicha infiltración. Por otro lado, el descenso observado en el número de Treg a los 6 meses del trasplante puede ser secundario al desarrollo de rechazo subclínico de los aloinjertos renales donde los infiltrados $FOXP3^+$ también aparecen. No obstante, esto sólo puede ser detectado en el caso de realizar biopsias de protocolo en los pacientes trasplantados [226]. El marcador indirecto de esta infiltración podría ser el descenso de las células Tregs en sangre encontrado en nuestro estudio. Este descenso en células Tregs se produce al tiempo que se detecta un aumento de células T efectoras $CD4^+CD25^-$ 6 meses después del trasplante. No observamos diferencias en la capacidad supresora de las células Tregs $CD4^+CD25^{high}$ entre los pacientes que sufren un rechazo y los pacientes libre de rechazo agudo, sugiriendo que la función supresora de las

células Tregs no estaba mermada en pacientes con episodios de rechazo en ningún punto de control comparado con los pacientes sin rechazo. Recientemente se ha publicado la presencia de la alorespuesta tanto por la vía directa como indirecta en receptores de trasplante renal de larga evolución, aunque únicamente la vía directa mediaba el daño del injerto [227].

Otro factor independiente que puede ser responsable de la caída del número de Tregs circulantes a los 6 meses post-trasplante es el fármaco el inmunosupresor usado. La inmunosupresión farmacológica es un elemento esencial para alcanzar un cierto grado de tolerancia al injerto. Actualmente, hay una tendencia a la reducción a largo plazo de la inmunosupresión para limitar sus complicaciones, principalmente nefropatía crónica de injerto y morbilidad cardiovascular [228-230]. Además, ha comenzado una tendencia al cambio en el uso de CNI hacia nuevos fármacos inmunosupresores, tales como los inhibidores de mTOR (por ejemplo Rapa), a los que se ha atribuido cierta capacidad tolerogénica, aunque mediante mecanismos aún desconocidos [231]. Un mecanismo propuesto recientemente es la expansión de células T reguladoras con efectos supresores en respuestas alo-inmunitarias [232, 233], aunque recientemente se ha demostrado que Rapa induce una capacidad supresora a las células T CD4⁺ convencionales *in vitro* [234]. En línea con esto, el estudio retrospectivo muestra como las células T con fenotipo y función reguladora están disminuidas en sangre periférica de pacientes que reciben inmunosupresión con CNI comparado con los pacientes que reciben tratamiento con Rapa.

Salama y colaboradores publicaron la presencia de una población de células T CD25⁺ capaces de disminuir la capacidad de respuesta frente a alo-antígenos del donante de las células T efectoras en 23 receptores de trasplante renal [235]. Sin embargo, el estudio no cuantificó el número de células Tregs en los receptores de

trasplante, ni identificó importantes diferencias fenotípicas en las células T CD25⁺, excepto para CD132 e ICOS [235]. A raíz de la publicación de este estudio, se han caracterizado mejores marcadores fenotípicos de células T reguladoras, principalmente FOXP3 [216, 236]. En el estudio objeto de este trabajo, los niveles de FOXP3 en las células T CD4⁺CD25⁺, medidos como la intensidad media de fluorescencia, fueron similares en ambos grupos de pacientes, tratados con CNI y Rapa (Figura 25). Sin embargo, la Figura 7 muestra claramente que la mayoría de las células T CD4⁺CD25^{low} no expresan FOXP3 pero todas las células T CD4⁺CD25^{high} lo hacen, y el grupo tratado con Rapa, tiene frecuencias más altas de células Tregs circulantes que el grupo tratado con CNI. Una implicación de este hallazgo es que la definición de las células T reguladoras sólo mediante marcaje positivo de CD25 no es un buen método. Aquí, hemos realizado un análisis fenotípico en sangre incluyendo los marcadores establecidos para células T reguladoras CD4⁺CD25⁺. La población celular que nosotros definimos como Treg mediante citometría de flujo mostró ser supresora en cultivos mixtos linfocitarios alogénicos. Una clara inhibición de la expansión de las células T CD4⁺CD25⁻ respondedoras se detectó tras cocultivo con células Tregs CD4⁺CD25^{high} del huésped en cultivo mixto linfocitario alogénico con esplenocitos del donante (Figura 26). No se realizó marcaje intracelular de CTLA-4 porque se ha demostrado que su expresión se suprime tras la exposición con un imTOR, Everolimus [237]. Se usó GITR como marcador de células T reguladoras aunque su expresión está aumentada tras la activación de células T, y la señal a través de él, se ha mostrado que revierte la actividad supresora de las células Tregs [238]. De hecho, aunque las diferencias no son significativas, los pacientes bajo terapia con CNI tendían a mostrar altos porcentajes de células T CD4⁺CD25⁺GITR⁺, que podría estar relacionado con un aumento de la activación celular en estos pacientes que no se mostró mediante otros marcadores de

activación, tales como HLA-DR o CD38. Además, el grupo de ERT, que normalmente tiene un estado pro-inflamatorio, tuvo frecuencias más elevadas de células T $CD4^+CD25^+GITR^+$ que el grupo de donantes sanos (Tabla 18). En cualquier caso, algún estado de activación es necesario para la función de las células Tregs y nuestros datos funcionales demuestran que las células T $CD4^+CD25^{high}$ son realmente supresoras.

El grupo de pacientes con inmunosupresión prolongada con CNI mostró niveles reducidos de células Tregs comparado con aquellos que reciben Rapa. Además, los niveles en este grupo, fueron equivalentes a los encontrados en el grupo de donantes sanos y en el grupo de receptores de aloinjerto renal de un primer donante cadáver en el momento del trasplante (ERT sin inmunosupresión). Esto sugiere que Rapa no tuvo efectos deletéreos sobre las células Tregs mientras que la terapia con CNI podría inducir un descenso en esta población celular. Baan y colaboradores encontraron que CNI inhibió la función de FOXP3 en Tregs humanas así como su función mientras que Rapa no lo hizo [233]. Una posibilidad es que una pérdida de Tregs sucede después del trasplante y que Rapa induce una recuperación de estas células, mientras que CNI no lo hace. Se ha sugerido, sin embargo, que las células Tregs aparecen temprano después de trasplante [235] y que los CNI podrían interferir con el establecimiento de células Tregs alorreactivas. Los datos mostrados en la Figura 24B sugieren que el descenso de células Tregs inducido por CNI, después del trasplante, puede ser recuperado mediante tratamiento con Rapa en ausencia de CNI, aunque se necesitan estudios prospectivos para confirmar esta hipótesis. Nuestro estudio prospectivo no lo puede validar dado el bajo número de pacientes tratados con imTOR. Recientemente se ha publicado en un modelo de tolerancia de trasplante cardíaco tras infusión de células Tregs aloantígeno específicas y tratamiento con TG y Rapa, en el que se conseguía supervivencia prolongada del injerto, pero con Tac o CsA no se conseguía, sugiriendo que la ruta de la

calcineurina es necesaria para el desarrollo de Tregs [239]. Otros grupos han publicado que las células T CD4⁺CD25⁺ en la periferia, pero no en el timo, son resistentes a la apoptosis acelerada inducida por Rapa [240]. Otra hipótesis tiene que ver con el reclutamiento de las células Tregs en el injerto. Las células Tregs CD4⁺CD25⁺ humano expresan CCR4 y CCR8 y muestran respuestas quimiotácticas a sus ligandos [241]. El mecanismo subyacente del descenso en el número de células Tregs en la periferia en presencia de CNI podría ser la alteración en la expresión de quimiocinas y sus receptores [242]. De acuerdo con esto, un trabajo en un modelo animal muestra que el reclutamiento de células Tregs que expresan Foxp3 en el injerto de tejido cardíaco depende del receptor de quimiocinas CCR4 [243]. Sin embargo no hay muchos datos acerca del efecto inmunosupresor sobre quimiocinas y sus receptores y ninguno acerca de su relación con CCR4 y CCR8 y sus ligandos [244].

Bensinger y colaboradores han demostrado que IL-2 es necesario para la supervivencia y proliferación de las células Tregs *in vitro* [245]. Además, IL-2 es esencial para el mantenimiento en la periferia de las células Tregs en modelos animales [246, 247]. Se ha sugerido que la inmunosupresión que interfiere con la señalización de IL-2, pero no con la producción de IL-2, permite a las células Tregs CD4⁺CD25⁺ funcionar en pacientes trasplantados [237]. Los inhibidores de mTOR suprimen la ruta de transducción de señal después de la unión de IL-2 a su receptor (Figura 18). Entonces, la ausencia de efecto de Rapa en el número de Tregs, junto con función normal de las células Tregs en pacientes tratados con el derivado de Rapa (Everolimus) [237], sugiere que los mTOR tienen una ventaja en promover tolerancia inmunológica sobre los CNI. Además, el ácido mofetil micofenolato (MMF), el cual actúa en la ruta de señalización de IL-2, facilita la generación de células reguladoras, como se demostró en diferentes modelos murinos de tolerancia a trasplante [248-249].

Nuestros resultados podrían verse influidos por la coadministración de otras drogas inmunosupresoras, tales como esteroides o MMF. Se mostró recientemente que el MMF preserva la función de las células Tregs murinas, así como su expansión y los niveles de expresión de Foxp3 cuando se administró tras trasplante de médula ósea [250]. Asimismo, los esteroides indujeron la expresión de FOXP3 y Tregs en pacientes con asma [251] y aumentó el número de células Tregs en sangre de pacientes con miastenia gravis que presentaban números reducidos cuando no fueron tratados [252]. Aunque nosotros no dirigimos el estudio sobre el efecto de estos inmunosupresores solos, principalmente por la ausencia de pacientes en monoterapia, la distribución de pacientes que recibieron esteroides y MMF en los grupos de Rapa y CNI era similar por lo que sugiere que no tienen influencia en los resultados que mostramos. Por otro lado, se ha demostrado que las terapias de inducción con anticuerpos mono o policlonales pueden influir en los porcentajes de células Tregs sanguíneas. Así, las terapias de inducción con anti-CD52 o Timoglobulina puede aumentar dos veces la frecuencia de Tregs dentro de los primeros 240 días post-trasplante [253]. Con todo, ninguno de los pacientes incluido en nuestro estudio retrospectivo recibió terapia de inducción con estos anticuerpos y, por lo tanto, nuestros resultados no están sesgados por el uso de estos anticuerpos.

La función renal mejorada en los pacientes tratados con Rapa puede ser debido a la retirada de los agentes CNI al cesar su acción vasoconstrictora [254]. Sin embargo, cuando examinamos solamente los pacientes que reciben Rapa desde el primer día post-trasplante sin CNI, se observa la misma diferencia en la función renal. La frecuencia de las células Tregs en pacientes tratados con Rapa casi no mostró asociación con mejor función renal medida como el incremento de filtración glomerular. Esta tendencia no fue estadísticamente significativa, probablemente debido al pequeño tamaño muestral.

Además, es difícil aislar el efecto nefrotóxico de los CNI de la ausencia de sus efectos tolerogénicos. Por lo tanto, el seguimiento a largo plazo de los receptores de trasplante renal tratados con Rapa ha demostrado, no sólo que se conserva la filtración glomerular en comparación con los tratados con CNI, sino que también se observa una mejora en la función renal [255, 256]. Este efecto se hace incluso más relevante cuando el período de seguimiento incrementa [231, 255-257]. Esto sugiere que, junto con la ausencia de efectos vasculares, Rapa puede inducir una mejora de la función renal a través de un efecto tolerogénico. Sin embargo, se necesita precaución a la hora de interpretar los resultados presentados aquí, hasta que se establezca un papel para las Tregs en el resultado del trasplante, con series más largas y/o estudio randomizados.

Con todo se describe un efecto deletéreo de los CNI sobre el número de células Tregs cuando se compara con la Rapa en receptores de trasplante renal estables de larga evolución. A este respecto, han surgido multitud de publicaciones mostrando una capacidad de los inhibidores de mTOR de inducir y/o mantener las células Tregs en modelos experimentales y en humanos [232-234, 258, 259]. Nuestros datos muestran como los niveles de Tac correlacionan inversamente con la función supresora de las células Tregs circulantes (Figura 23). Especialmente a los 6 meses después del trasplante. Este efecto fue más evidente en el grupo de pacientes con rechazo que recibieron dosis más elevadas de Tac (datos no mostrados). Además, previamente, se ha mostrado que en pacientes de trasplante hepático con dosis terapéuticas elevadas tenían menos Tregs circulantes que los pacientes con niveles de Tac por debajo de la ventana terapéutica [260].

Aunque 9 pacientes tuvieron terapia de inducción con anti-CD25, no se observó diferencia a los 6 meses en la capacidad supresora con respecto a los pacientes no inducidos, esto podría ser explicado porque el anticuerpo anti-CD25 tiene una vida

media de 14-16 días. Esta observación fue recientemente corroborada tras el análisis de pacientes tratados con anti-CD25 en los que se observó un descenso temporal de la frecuencia relativa de células $CD4^+CD25^+$ pero no en la frecuencia de $CD4^+Foxp3^+$, además observaron que la función de las células Tregs no se vio afectada por el tratamiento con anti-CD25 [261]. Cuando se administró anti-CD25 junto a betalcept (Ig-CTLA-4 que bloquea la señal coestimuladora CD28-B7) también se observó un descenso transitorio de células $CD25^+$, sin embargo no se observaron diferencias a largo plazo [262].

Consideramos que la recuperación en el número de células Tregs circulantes después del primer año post-trasplante puede servir como una herramienta para la monitorización para decidir a comenzar protocolos de minimización de inmunosupresión en los receptores de trasplante renal estable a largo plazo, especialmente, en aquellos con mayores números de Tregs circulantes. Esto está apoyado por la asociación de altos niveles de Tac y menor número de células Tregs circulantes. A este respecto, un trabajo reciente apunta al posible papel del ratio de las células T memoria y Tregs como herramienta para la monitorización de la inmunosupresión [263]. Por lo tanto, la cuantificación de las células Tregs sanguíneas podría ayudar a los clínicos a comenzar estos protocolos.

Finalmente, a pesar de ser consideradas como células tolerogénicas y estar asociadas con mejores resultados del injerto y función renal en estudios previos [225, 226, 264], en el estudio prospectivo no se encuentra asociación entre número de células Tregs $CD4^+$ y función renal en ningún punto de control. Esta observación está de acuerdo con otros estudios [265, 266]. Esto no es sorprendente dada la complejidad de los mecanismos involucrados en el resultado del trasplante. Se necesitan más estudios

para determinar el efecto real del número de las células Tregs en el resultado del injerto y del paciente.

En conclusión, aunque nuestros resultados están basados en una cohorte relativamente pequeña, éstos aportan la primera evidencia de la cinética en sangre de las células Tregs durante 2 años después del trasplante. Estas células descienden en los primeros 6 meses post-trasplante y, posteriormente, aumenta progresivamente hasta los niveles basales. Obviamente, se necesita validar estos resultados en estudios multicéntricos con cohortes más amplias, antes de establecer a las Tregs como herramienta para reducir la inmunosupresión en trasplante renal.

Además se muestra que el tratamiento con CNI en receptores de trasplante renal reduce el número de células T CD4⁺CD25^{high} sanguíneas con fenotipo regulador cuando se compara con la terapia con Rapa. Se necesitan estudios prospectivos con mayor número de pacientes para confirmar el impacto de esta reducción en la función renal. Nuestras observaciones sugieren que el uso de Rapa en vez de CNI puede permitir alcanzar un verdadero estado de tolerancia al favorecer el establecimiento de las células Tregs en el manejo a largo plazo de trasplante renal. Además, la detección de un elevado número de células Tregs sanguíneas podría ser utilizada como herramienta para identificar aquellos pacientes candidatos a reducir la terapia inmunosupresora.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. El número absoluto de leucocitos sanguíneos, pero no de linfocitos, se encuentra disminuido durante los dos años de seguimiento post-trasplante renal.
2. Las células Tregs ($CD4^+CD25^{\text{high}}FOXP3^+$) en sangre caen significativamente a los seis meses del trasplante y se recuperan al año, para seguir aumentando en el segundo año por encima de los valores pre-trasplante.
3. La capacidad supresora *in vitro* frente a antígenos del donante de las células con fenotipo Treg ($CD4^+CD25^{\text{high}}FOXP3^+$) esta inhibida a los seis meses del trasplante pero posteriormente alcanza una efectividad del 30-50%.
4. Las cifras absolutas de linfocitos $CD8^+CD28^-$ sanguíneos están aumentadas respecto al momento pre-trasplante renal en todos los puntos de monitorización. Las células con fenotipo NKT ($CD3^+CD16^+CD56^+$) no muestran cambios significativos.
5. Los pacientes retrasplantados tienen una tendencia no significativa a mostrar cifras más bajas de células Tregs ($CD4^+CD25^{\text{high}}FOXP3^+$) que los que reciben su primer injerto renal.
6. Los pacientes que sufren necrosis tubular aguda tienden a presentar menores números absolutos de células Tregs ($CD4^+CD25^{\text{high}}FOXP3^+$) y células $CD8^+CD28^-$ que los que no lo sufren, mientras que no se observan cambios en las células NKT ($CD3^+CD16^+CD56^+$).
7. El desarrollo de un episodio de rechazo agudo en los primeros seis meses post-trasplante renal induce una caída en todos los puntos de control post-trasplante de los números de células Treg ($CD4^+CD25^{\text{high}}FOXP3^+$), células $CD8^+CD28^-$ y células NKT ($CD3^+CD16^+CD56^+$).

8. El tratamiento de inducción con anticuerpos anti-CD25 induce un aumento significativo de las células Treg ($CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$) a los 6 meses del trasplante renal, que no se mantiene en puntos posteriores de control.
9. El tratamiento con Rapamicina induce cifras más elevadas en sangre de células Treg ($CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$) que el tratamiento con inhibidores de la calcineurina (Tacrolimus o Ciclosporina), sin afectar a la función reguladora *in vitro*.
10. El tratamiento con Rapamicina es capaz de recuperar los niveles de células Treg ($CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$) circulantes que han caído con el tratamiento previo con inhibidores de la calcineurina.
11. No se evidenció una asociación significativamente estadística entre las cifras de células Treg ($CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$) y la función renal en cada punto de monitorización post-trasplante, pero sí se observó que el aumento de las células Treg ($CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$) a los dos años del trasplante fue mayor en aquellos trasplantados con mejor función renal.

8. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Cecka, J.M. and P.I. Terasaki, *Early rejection episodes*. Clin Transpl, 1989: p. 425-34.
2. Hariharan, S., et al., *Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996*. N Engl J Med, 2000. 342(9): p. 605-12.
3. Solez, K., et al., *International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology*. Kidney Int, 1993. 44(2): p. 411-22.
4. Solez, K., et al., *Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN')*. Am J Transplant, 2007. 7(3): p. 518-26.
5. Almond, P.S., et al., *Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients*. Transplantation, 1993. 55(4): p. 752-6; discussion 756-7.
6. Vasconcellos, L.M., et al., *Cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood leukocytes correlates with rejecting renal allografts*. Transplantation, 1998. 66(5): p. 562-6.
7. Li, B., et al., *Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine*. N Engl J Med, 2001. 344(13): p. 947-54.
8. Suthanthiran, M., *Molecular analyses of human renal allografts: differential intragraft gene expression during rejection*. Kidney Int Suppl, 1997. 58: p. S15-21.
9. Andreoni, K.A., et al., *Kidney and pancreas transplantation in the United States, 1996-2005*. Am J Transplant, 2007. 7(5 Pt 2): p. 1359-75.
10. Nankivell, B.J., et al., *Effect of histological damage on long-term kidney transplant outcome*. Transplantation, 2001. 71(4): p. 515-23.
11. Massy, Z.A., et al., *Chronic renal allograft rejection: immunologic and nonimmunologic risk factors*. Kidney Int, 1996. 49(2): p. 518-24.
12. Chapman, J.R., P.J. O'Connell, and B.J. Nankivell, *Chronic renal allograft dysfunction*. J Am Soc Nephrol, 2005. 16(10): p. 3015-26.
13. Racusen, L.C., et al., *The Banff 97 working classification of renal allograft pathology*. Kidney Int, 1999. 55(2): p. 713-23.
14. Remuzzi, G. and T. Bertani, *Renal vascular and thrombotic effects of cyclosporine*. Am J Kidney Dis, 1989. 13(4): p. 261-72.
15. de Mattos, A.M., A.J. Olyaei, and W.M. Bennett, *Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future*. Am J Kidney Dis, 2000. 35(2): p. 333-46.
16. Taylor, A.L., R. Marcus, and J.A. Bradley, *Post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD) after solid organ transplantation*. Crit Rev Oncol Hematol, 2005. 56(1): p. 155-67.
17. Orlando, G., S. Soker, and K. Wood, *Operational tolerance after liver transplantation*. J Hepatol, 2009. 50(6): p. 1247-57.
18. Arnold, B., G. Schonrich, and G.J. Hammerling, *Multiple levels of peripheral tolerance*. Immunol Today, 1993. 14(1): p. 12-4.
19. Scully, R., et al., *Mechanisms in CD4 antibody-mediated transplantation tolerance: kinetics of induction, antigen dependency and role of regulatory T cells*. Eur J Immunol, 1994. 24(10): p. 2383-92.

20. Manilay, J.O., et al., *Intrathymic deletion of alloreactive T cells in mixed bone marrow chimeras prepared with a nonmyeloablative conditioning regimen*. Transplantation, 1998. 66(1): p. 96-102.
21. Wells, A.D., et al., *Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance*. Nat Med, 1999. 5(11): p. 1303-7.
22. Lombardi, G., et al., *Anergic T cells as suppressor cells in vitro*. Science, 1994. 264(5165): p. 1587-9.
23. Bishop, G.A., et al., *High-dose/activation-associated tolerance: a mechanism for allograft tolerance*. Transplantation, 1997. 64(10): p. 1377-82.
24. Hamano, K., et al., *The effect of intrathymic injection of donor blood on the graft versus host reaction and cardiac allograft survival in the rat*. Immunol Cell Biol, 1991. 69 (Pt 3): p. 185-9.
25. Khan, A., Y. Tomita, and M. Sykes, *Thymic dependence of loss of tolerance in mixed allogeneic bone marrow chimeras after depletion of donor antigen. Peripheral mechanisms do not contribute to maintenance of tolerance*. Transplantation, 1996. 62(3): p. 380-7.
26. Gershon, R.K. and K. Kondo, *Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes*. Immunology, 1970. 18(5): p. 723-37.
27. Gershon, R.K. and K. Kondo, *Infectious immunological tolerance*. Immunology, 1971. 21(6): p. 903-14.
28. Green, D.R., P.M. Flood, and R.K. Gershon, *Immunoregulatory T-cell pathways*. Annu Rev Immunol, 1983. 1: p. 439-63.
29. Bloom, B.R., P. Salgame, and B. Diamond, *Revisiting and revising suppressor T cells*. Immunol Today, 1992. 13(4): p. 131-6.
30. Dorf, M.E., V.K. Kuchroo, and M. Collins, *Suppressor T cells: some answers but more questions*. Immunol Today, 1992. 13(7): p. 241-3.
31. Reinherz, E.L. and S.F. Schlossman, *The differentiation and function of human T lymphocytes*. Cell, 1980. 19(4): p. 821-7.
32. Sakaguchi, S., et al., *Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease*. J Exp Med, 1985. 161(1): p. 72-87.
33. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. 155(3): p. 1151-64.
34. Shevach, E.M., *Regulatory T cells in autoimmunity**. Annu Rev Immunol, 2000. 18: p. 423-49.
35. Shevach, E.M., *Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells*. J Exp Med, 2001. 193(11): p. F41-6.
36. Sakaguchi, S., *Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance*. Cell, 2000. 101(5): p. 455-8.
37. Apostolou, I., et al., *Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen*. Nat Immunol, 2002. 3(8): p. 756-63.
38. Curotto de Lafaille, M.A. and J.J. Lafaille, *CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy*. Curr Opin Immunol, 2002. 14(6): p. 771-8.
39. Jordan, M.S., et al., *Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide*. Nat Immunol, 2001. 2(4): p. 301-6.
40. Kawahata, K., et al., *Generation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in the thymus*

- and from nonautoreactive T cells by endogenous TCR expression. *J Immunol*, 2002. 168(9): p. 4399-405.
41. Stephens, G.L. and L. Ignatowicz, *Decreasing the threshold for thymocyte activation biases CD4+ T cells toward a regulatory (CD4+CD25+) lineage*. *Eur J Immunol*, 2003. 33(5): p. 1282-91.
 42. Baecher-Allan, C., et al., *CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood*. *J Immunol*, 2001. 167(3): p. 1245-53.
 43. Bennett, C.L., et al., *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3*. *Nat Genet*, 2001. 27(1): p. 20-1.
 44. Blair, P.J., et al., *CD4+CD8- T cells are the effector cells in disease pathogenesis in the scurfy (sf) mouse*. *J Immunol*, 1994. 153(8): p. 3764-74.
 45. Godfrey, V.L., et al., *Fatal lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mouse requires T cells that mature in a sf thymic environment: potential model for thymic education*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(13): p. 5528-32.
 46. Lyon, M.F., et al., *The scurfy mouse mutant has previously unrecognized hematological abnormalities and resembles Wiskott-Aldrich syndrome*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. 87(7): p. 2433-7.
 47. Brunkow, M.E., et al., *Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse*. *Nat Genet*, 2001. 27(1): p. 68-73.
 48. Schubert, L.A., et al., *Scurfy (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation*. *J Biol Chem*, 2001. 276(40): p. 37672-9.
 49. Walker, M.R., et al., *Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells*. *J Clin Invest*, 2003. 112(9): p. 1437-43.
 50. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. *Nat Immunol*, 2003. 4(4): p. 330-6.
 51. Liu, W., et al., *CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells*. *J Exp Med*, 2006. 203(7): p. 1701-11.
 52. Seddiki, N., 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): p. 1693-700.
 53. Serra, P., et al., *CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells*. *Immunity*, 2003. 19(6): p. 877-89.
 54. Cederbom, L., H. Hall, and F. Ivars, *CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells*. *Eur J Immunol*, 2000. 30(6): p. 1538-43.
 55. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state*. *Int Immunol*, 1998. 10(12): p. 1969-80.
 56. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production*. *J Exp Med*, 1998. 188(2): p. 287-96.
 57. Janssens, W., et al., *CD4+CD25+ T cells lyse antigen-presenting B cells by Fas-Fas ligand interaction in an epitope-specific manner*. *J Immunol*, 2003. 171(9): p. 4604-12.

58. Thornton, A.M., et al., *Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4⁺CD25⁺ T cell suppressor function*. J Immunol, 2004. 172(11): p. 6519-23.
59. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*. J Exp Med, 2000. 192(2): p. 303-10.
60. Thornton, A.M., C.A. Piccirillo, and E.M. Shevach, *Activation requirements for the induction of CD4⁺CD25⁺ T cell suppressor function*. Eur J Immunol, 2004. 34(2): p. 366-76.
61. Yamazaki, S., et al., *Direct expansion of functional CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells*. J Exp Med, 2003. 198(2): p. 235-47.
62. Ng, W.F., et al., *Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells*. Blood, 2001. 98(9): p. 2736-44.
63. Jonuleit, H., et al., *Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood*. J Exp Med, 2001. 193(11): p. 1285-94.
64. Dieckmann, D., et al., *Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood*. J Exp Med, 2001. 193(11): p. 1303-10.
65. Levings, M.K., R. Sangregorio, and M.G. Roncarolo, *Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function*. J Exp Med, 2001. 193(11): p. 1295-302.
66. Mellor, A.L. and D.H. Munn, *IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism*. Nat Rev Immunol, 2004. 4(10): p. 762-74.
67. Grossman, W.J., et al., *Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death*. Immunity, 2004. 21(4): p. 589-601.
68. Liu, H., et al., *Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(18): p. 7048-53.
69. Yang, Y., et al., *Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance*. Nat Immunol, 2004. 5(5): p. 508-15.
70. Pasare, C. and R. Medzhitov, *Toll pathway-dependent blockade of CD4⁺CD25⁺ T cell-mediated suppression by dendritic cells*. Science, 2003. 299(5609): p. 1033-6.
71. Shevach, E.M., *CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers*. Nat Rev Immunol, 2002. 2(6): p. 389-400.
72. Wood, K.J. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells in transplantation tolerance*. Nat Rev Immunol, 2003. 3(3): p. 199-210.
73. Roncarolo, M.G. and M.K. Levings, *The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity*. Curr Opin Immunol, 2000. 12(6): p. 676-83.
74. Battaglia, M., et al., *Tr1 cells: from discovery to their clinical application*. Semin Immunol, 2006. 18(2): p. 120-7.
75. Levings, M.K. and M.G. Roncarolo, *Phenotypic and functional differences between human CD4⁺CD25⁺ and type 1 regulatory T cells*. Curr Top Microbiol Immunol, 2005. 293: p. 303-26.
76. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu Rev Immunol, 2001. 19: p. 683-765.
77. Groux, H., et al., *Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8⁺ T cells*. J Immunol, 1998. 160(7): p. 3188-93.

78. Asadullah, K., W. Sterry, and H.D. Volk, *Interleukin-10 therapy--review of a new approach*. Pharmacol Rev, 2003. 55(2): p. 241-69.
79. Groux, H., et al., *A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis*. Nature, 1997. 389(6652): p. 737-42.
80. Bacchetta, R., et al., *Host-reactive CD4+ and CD8+ T cell clones isolated from a human chimera produce IL-5, IL-2, IFN-gamma and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor but not IL-4*. J Immunol, 1990. 144(3): p. 902-8.
81. Bacchetta, R., et al., *High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells*. J Exp Med, 1994. 179(2): p. 493-502.
82. Bacchetta, R., et al., *Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines*. Eur J Immunol, 2002. 32(8): p. 2237-45.
83. Sebastiani, S., et al., *Chemokine receptor expression and function in CD4+ T lymphocytes with regulatory activity*. J Immunol, 2001. 166(2): p. 996-1002.
84. Levings, M.K., et al., *Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells*. Blood, 2005. 105(3): p. 1162-9.
85. Liang, B., et al., *Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II*. J Immunol, 2008. 180(9): p. 5916-26.
86. Sarris, M., et al., *Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition*. Immunity, 2008. 28(3): p. 402-13.
87. Barrat, F.J., et al., *In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines*. J Exp Med, 2002. 195(5): p. 603-16.
88. Levings, M.K., et al., *IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells*. J Immunol, 2001. 166(9): p. 5530-9.
89. Veldman, C., et al., *Type 1 regulatory T cells specific for desmoglein 3 are more frequently detected in healthy individuals than in patients with pemphigus vulgaris*. J Immunol, 2004. 172(10): p. 6468-75.
90. Groux, H., *Type 1 T-regulatory cells: their role in the control of immune responses*. Transplantation, 2003. 75(9 Suppl): p. 8S-12S.
91. Pestka, S., et al., *Interleukin-10 and related cytokines and receptors*. Annu Rev Immunol, 2004. 22: p. 929-79.
92. Strobl, H. and W. Knapp, *TGF-beta1 regulation of dendritic cells*. Microbes Infect, 1999. 1(15): p. 1283-90.
93. Cerwenka, A. and S.L. Swain, *TGF-beta1: immunosuppressant and viability factor for T lymphocytes*. Microbes Infect, 1999. 1(15): p. 1291-6.
94. Deaglio, S., et al., *Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression*. J Exp Med, 2007. 204(6): p. 1257-65.
95. Borsellino, G., et al., *Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression*. Blood, 2007. 110(4): p. 1225-32.
96. Kobie, J.J., et al., *T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine*. J Immunol, 2006. 177(10): p. 6780-6.

97. Sakaguchi, S., *Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses*. *Annu Rev Immunol*, 2004. 22: p. 531-62.
98. Shevach, E.M., *Regulatory/suppressor T cells in health and disease*. *Arthritis Rheum*, 2004. 50(9): p. 2721-4.
99. Walker, M.R., et al., *De novo generation of antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from human CD4+CD25- cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(11): p. 4103-8.
100. Levings, M.K., et al., *Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells*. *J Exp Med*, 2002. 196(10): p. 1335-46.
101. Foussat, A., et al., *A comparative study between T regulatory type 1 and CD4+CD25+ T cells in the control of inflammation*. *J Immunol*, 2003. 171(10): p. 5018-26.
102. Huehn, J. and A. Hamann, *Homing to suppress: address codes for Treg migration*. *Trends Immunol*, 2005. 26(12): p. 632-6.
103. Chen, Y., et al., *Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis*. *Science*, 1994. 265(5176): p. 1237-40.
104. Whitacre, C.C., et al., *Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. III. Evidence for clonal anergy*. *J Immunol*, 1991. 147(7): p. 2155-63.
105. Chen, Y., et al., *Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance*. *Nature*, 1995. 376(6536): p. 177-80.
106. Miller, A., et al., *Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(1): p. 421-5.
107. Lider, O., et al., *Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein. II. Suppression of disease and in vitro immune responses is mediated by antigen-specific CD8+ T lymphocytes*. *J Immunol*, 1989. 142(3): p. 748-52.
108. Santos, L.M., et al., *Oral tolerance to myelin basic protein induces regulatory TGF-beta-secreting T cells in Peyer's patches of SJL mice*. *Cell Immunol*, 1994. 157(2): p. 439-47.
109. Chen, Y., J. Inobe, and H.L. Weiner, *Induction of oral tolerance to myelin basic protein in CD8-depleted mice: both CD4+ and CD8+ cells mediate active suppression*. *J Immunol*, 1995. 155(2): p. 910-6.
110. Takeuchi, M., P. Alard, and J.W. Streilein, *TGF-beta promotes immune deviation by altering accessory signals of antigen-presenting cells*. *J Immunol*, 1998. 160(4): p. 1589-97.
111. Seder, R.A., et al., *Factors involved in the differentiation of TGF-beta-producing cells from naive CD4+ T cells: IL-4 and IFN-gamma have opposing effects, while TGF-beta positively regulates its own production*. *J Immunol*, 1998. 160(12): p. 5719-28.
112. Doetze, A., et al., *Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by T(h)3/T(r)1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a T(h)1 to T(h)2 shift*. *Int Immunol*, 2000. 12(5): p. 623-30.

113. Kitani, A., et al., *Activated self-MHC-reactive T cells have the cytokine phenotype of Th3/T regulatory cell 1 T cells*. J Immunol, 2000. 165(2): p. 691-702.
114. Fukaura, H., et al., *Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients*. J Clin Invest, 1996. 98(1): p. 70-7.
115. Stanton, T.H., et al., *The Qa-1 antigenic system. Relation of Qa-1 phenotypes to lymphocyte sets, mitogen responses, and immune functions*. J Exp Med, 1978. 148(4): p. 963-73.
116. Eardley, D.D., et al., *Immunoregulatory circuits among T-cell sets. I. T-helper cells induce other T-cell sets to exert feedback inhibition*. J Exp Med, 1978. 147(4): p. 1106-15.
117. Jiang, H., S.I. Zhang, and B. Pernis, *Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis*. Science, 1992. 256(5060): p. 1213-5.
118. Koh, D.R., et al., *Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8-/- mice*. Science, 1992. 256(5060): p. 1210-3.
119. Jiang, H., et al., *Murine CD8+ T cells that specifically delete autologous CD4+ T cells expressing V beta 8 TCR: a role of the Qa-1 molecule*. Immunity, 1995. 2(2): p. 185-94.
120. Jiang, H. and L. Chess, *The specific regulation of immune responses by CD8+ T cells restricted by the MHC class Ib molecule, Qa-1*. Annu Rev Immunol, 2000. 18: p. 185-216.
121. Hu, D., et al., *Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice*. Nat Immunol, 2004. 5(5): p. 516-23.
122. Li, J., et al., *Induction of TCR Vbeta-specific CD8+ CTLs by TCR Vbeta-derived peptides bound to HLA-E*. J Immunol, 2001. 167(7): p. 3800-8.
123. Najafian, N., et al., *Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model*. J Clin Invest, 2003. 112(7): p. 1037-48.
124. Chang, C.C., et al., *Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4*. Nat Immunol, 2002. 3(3): p. 237-43.
125. Vlad, G., R. Cortesini, and N. Suciuc-Foca, *License to heal: bidirectional interaction of antigen-specific regulatory T cells and tolerogenic APC*. J Immunol, 2005. 174(10): p. 5907-14.
126. Gilliet, M. and Y.J. Liu, *Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells*. J Exp Med, 2002. 195(6): p. 695-704.
127. Wei, S., et al., *Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma*. Cancer Res, 2005. 65(12): p. 5020-6.
128. Rifai, M., et al., *Essential roles of CD8+CD122+ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis*. J Exp Med, 2004. 200(9): p. 1123-34.
129. Endharti, A.T., et al., *Cutting edge: CD8+CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells*. J Immunol, 2005. 175(11): p. 7093-7.
130. Saitoh, O., et al., *CD8+CD122+ T cells, a newly identified regulatory T subset, negatively regulate Graves' hyperthyroidism in a murine model*. Endocrinology, 2007. 148(12): p. 6040-6.
131. Dellabona, P., et al., *An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells*. J Exp Med, 1994. 180(3): p. 1171-6.

132. Porcelli, S., et al., *Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain.* J Exp Med, 1993. 178(1): p. 1-16.
133. Brossay, L., et al., *CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution.* J Exp Med, 1998. 188(8): p. 1521-8.
134. Exley, M., et al., *Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24+ CD4-CD8- T cells.* J Exp Med, 1997. 186(1): p. 109-20.
135. Bendelac, A., et al., *A subset of CD4+ thymocytes selected by MHC class I molecules.* Science, 1994. 263(5154): p. 1774-8.
136. Bendelac, A., et al., *CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes.* Science, 1995. 268(5212): p. 863-5.
137. Bendelac, A., *Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes.* J Exp Med, 1995. 182(6): p. 2091-6.
138. Benlagha, K., et al., *A thymic precursor to the NK T cell lineage.* Science, 2002. 296(5567): p. 553-5.
139. McNab, F.W., et al., *The influence of CD1d in postselection NKT cell maturation and homeostasis.* J Immunol, 2005. 175(6): p. 3762-8.
140. Godfrey, D.I., et al., *NKT cells: what's in a name?* Nat Rev Immunol, 2004. 4(3): p. 231-7.
141. Gombert, J.M., et al., *Early quantitative and functional deficiency of NK1+-like thymocytes in the NOD mouse.* Eur J Immunol, 1996. 26(12): p. 2989-98.
142. Godfrey, D.I., et al., *NKT cells: facts, functions and fallacies.* Immunol Today, 2000. 21(11): p. 573-83.
143. Bendelac, A., et al., *Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function.* Annu Rev Immunol, 1997. 15: p. 535-62.
144. Sharif, S., et al., *Regulatory natural killer T cells protect against spontaneous and recurrent type 1 diabetes.* Ann N Y Acad Sci, 2002. 958: p. 77-88.
145. D'Orazio, T.J. and J.Y. Niederkorn, *A novel role for TGF-beta and IL-10 in the induction of immune privilege.* J Immunol, 1998. 160(5): p. 2089-98.
146. Hayakawa, Y., D.I. Godfrey, and M.J. Smyth, *Alpha-galactosylceramide: potential immunomodulatory activity and future application.* Curr Med Chem, 2004. 11(2): p. 241-52.
147. Matsuda, J.L., et al., *Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers.* J Exp Med, 2000. 192(5): p. 741-54.
148. Matsuda, J.L., et al., *Mouse V alpha 14i natural killer T cells are resistant to cytokine polarization in vivo.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(14): p. 8395-400.
149. Crowe, N.Y., et al., *Glycolipid antigen drives rapid expansion and sustained cytokine production by NK T cells.* J Immunol, 2003. 171(8): p. 4020-7.
150. Godfrey, D.I. and M. Kronenberg, *Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells.* J Clin Invest, 2004. 114(10): p. 1379-88.
151. Priatel, J.J., O. Utting, and H.S. Teh, *TCR/self-antigen interactions drive double-negative T cell peripheral expansion and differentiation into suppressor cells.* J Immunol, 2001. 167(11): p. 6188-94.
152. Zhang, Z.X., et al., *Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression.* Nat Med, 2000. 6(7): p. 782-9.

153. Young, K.J., et al., *Inhibition of graft-versus-host disease by double-negative regulatory T cells*. J Immunol, 2003. 171(1): p. 134-41.
154. Young, K.J., et al., *Antitumor activity mediated by double-negative T cells*. Cancer Res, 2003. 63(22): p. 8014-21.
155. Wang, R., Y. Wang-Zhu, and H. Grey, *Interactions between double positive thymocytes and high affinity ligands presented by cortical epithelial cells generate double negative thymocytes with T cell regulatory activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(4): p. 2181-6.
156. Fischer, K., et al., *Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells*. Blood, 2005. 105(7): p. 2828-35.
157. Hall, B.M., et al., *Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. III. Further characterization of the CD4+ suppressor cell and its mechanisms of action*. J Exp Med, 1990. 171(1): p. 141-57.
158. Hara, M., et al., *IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo*. J Immunol, 2001. 166(6): p. 3789-96.
159. Zheng, X.X., et al., *Favorably tipping the balance between cytopathic and regulatory T cells to create transplantation tolerance*. Immunity, 2003. 19(4): p. 503-14.
160. Graca, L., et al., *Both CD4(+)CD25(+) and CD4(+)CD25(-) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance*. J Immunol, 2002. 168(11): p. 5558-65.
161. Kingsley, C.I., et al., *CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses*. J Immunol, 2002. 168(3): p. 1080-6.
162. van Maurik, A., et al., *Cutting edge: CD4+CD25+ alloantigen-specific immunoregulatory cells that can prevent CD8+ T cell-mediated graft rejection: implications for anti-CD154 immunotherapy*. J Immunol, 2002. 169(10): p. 5401-4.
163. Lechler, R.I. and J.R. Batchelor, *Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells*. J Exp Med, 1982. 155(1): p. 31-41.
164. Auchincloss, H., Jr., et al., *The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(8): p. 3373-7.
165. Wise, M.P., et al., *Linked suppression of skin graft rejection can operate through indirect recognition*. J Immunol, 1998. 161(11): p. 5813-6.
166. Graca, L., S.P. Cobbold, and H. Waldmann, *Identification of regulatory T cells in tolerated allografts*. J Exp Med, 2002. 195(12): p. 1641-6.
167. Jiang, S. and R.I. Lechler, *Regulatory T cells in the control of transplantation tolerance and autoimmunity*. Am J Transplant, 2003. 3(5): p. 516-24.
168. Trenado, A., et al., *Ex vivo-expanded CD4+CD25+ immunoregulatory T cells prevent graft-versus-host-disease by inhibiting activation/differentiation of pathogenic T cells*. J Immunol, 2006. 176(2): p. 1266-73.
169. Taylor, P.A., et al., *L-Selectin(hi) but not the L-selectin(lo) CD4+25+ T-regulatory cells are potent inhibitors of GVHD and BM graft rejection*. Blood, 2004. 104(12): p. 3804-12.

170. Edinger, M., 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(9): p. 1144-50.
171. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance*. Immunol Rev, 2001. 182: p. 18-32.
172. Hoffmann, P., et al., *Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation*. J Exp Med, 2002. 196(3): p. 389-99.
173. Cohen, J.L., et al., *CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease*. J Exp Med, 2002. 196(3): p. 401-6.
174. Qin, S., et al., *"Infectious" transplantation tolerance*. Science, 1993. 259(5097): p. 974-7.
175. Jonuleit, H., et al., *Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells*. J Exp Med, 2002. 196(2): p. 255-60.
176. Dieckmann, D., et al., *Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]*. J Exp Med, 2002. 196(2): p. 247-53.
177. Cobbold, S.P., et al., *Infectious tolerance via the consumption of essential amino acids and mTOR signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(29): p. 12055-60.
178. Andersson, J., et al., *CD4+ FoxP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner*. J Exp Med, 2008. 205(9): p. 1975-81.
179. Onodera, K., et al., *Type 2 helper T cell-type cytokines and the development of "infectious" tolerance in rat cardiac allograft recipients*. J Immunol, 1997. 158(4): p. 1572-81.
180. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific*. J Immunol, 2000. 164(1): p. 183-90.
181. Azuma, T., et al., *Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions*. Cancer Res, 2003. 63(15): p. 4516-20.
182. Camara, N.O., F. Seville, and R.I. Lechler, *Human CD4+CD25+ regulatory cells have marked and sustained effects on CD8+ T cell activation*. Eur J Immunol, 2003. 33(12): p. 3473-83.
183. Yamagiwa, S., et al., *A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood*. J Immunol, 2001. 166(12): p. 7282-9.
184. VanBuskirk, A.M., et al., *Human allograft acceptance is associated with immune regulation*. J Clin Invest, 2000. 106(1): p. 145-55.
185. Battaglia, M., et al., *Rapamycin and interleukin-10 treatment induces T regulatory type 1 cells that mediate antigen-specific transplantation tolerance*. Diabetes, 2006. 55(1): p. 40-9.
186. Asiedu, C.K., et al., *Elevated T regulatory cells in long-term stable transplant tolerance in rhesus macaques induced by anti-CD3 immunotoxin and deoxyspergualin*. J Immunol, 2005. 175(12): p. 8060-8.
187. Josien, R., et al., *A critical role for transforming growth factor-beta in donor transfusion-induced allograft tolerance*. J Clin Invest, 1998. 102(11): p. 1920-6.

188. Kosiewicz, M.M., P. Alard, and J.W. Streilein, *Alterations in cytokine production following intraocular injection of soluble protein antigen: impairment in IFN-gamma and induction of TGF-beta and IL-4 production*. J Immunol, 1998. 161(10): p. 5382-90.
189. Faria, A.M. and H.L. Weiner, *Oral tolerance*. Immunol Rev, 2005. 206: p. 232-59.
190. Aramaki, O., et al., *Interleukin-10 but not transforming growth factor-beta is essential for generation and suppressor function of regulatory cells induced by intratracheal delivery of alloantigen*. Transplantation, 2005. 79(5): p. 568-76.
191. Niederkorn, J.Y. and E. Mayhew, *Phenotypic analysis of oral tolerance to alloantigens: evidence that the indirect pathway of antigen presentation is involved*. Transplantation, 2002. 73(9): p. 1493-500.
192. Niimi, M., et al., *Oral antigen induces allograft survival by linked suppression via the indirect pathway*. Transplant Proc, 2001. 33(1-2): p. 81.
193. Liu, Y., et al., *The protective effect of CD8+CD28- T suppressor cells on the acute rejection responses in rat liver transplantation*. Transplant Proc, 2007. 39(10): p. 3396-403.
194. Colovai, A.I., et al., *Induction of xenoreactive CD4+ T-cell anergy by suppressor CD8+CD28- T cells*. Transplantation, 2000. 69(7): p. 1304-10.
195. Ciubotariu, R., et al., *Specific suppression of human CD4+ Th cell responses to pig MHC antigens by CD8+CD28- regulatory T cells*. J Immunol, 1998. 161(10): p. 5193-202.
196. Li, J., et al., *T suppressor lymphocytes inhibit NF-kappa B-mediated transcription of CD86 gene in APC*. J Immunol, 1999. 163(12): p. 6386-92.
197. Lin, Y.X., et al., *Analysis of CD8+CD28- T-suppressor cells in living donor liver transplant recipients*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2009. 8(3): p. 241-6.
198. Balk, S.P., P.A. Bleicher, and C. Terhorst, *Isolation and characterization of a cDNA and gene coding for a fourth CD1 molecule*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. 86(1): p. 252-6.
199. Toyofuku, A., et al., *Natural killer T-cells participate in rejection of islet allografts in the liver of mice*. Diabetes, 2006. 55(1): p. 34-9.
200. Yasunami, Y., et al., *Valpha14 NK T cell-triggered IFN-gamma production by Gr-1+CD11b+ cells mediates early graft loss of syngeneic transplanted islets*. J Exp Med, 2005. 202(7): p. 913-8.
201. Oh, K., et al., *Direct regulatory role of NKT cells in allogeneic graft survival is dependent on the quantitative strength of antigenicity*. J Immunol, 2005. 174(4): p. 2030-6.
202. Seino, K.I., et al., *Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(5): p. 2577-81.
203. Jiang, X., et al., *Cutting edge: critical role of CXCL16/CXCR6 in NKT cell trafficking in allograft tolerance*. J Immunol, 2005. 175(4): p. 2051-5.
204. Ikehara, Y., et al., *CD4(+) Valpha14 natural killer T cells are essential for acceptance of rat islet xenografts in mice*. J Clin Invest, 2000. 105(12): p. 1761-7.
205. Sonoda, K.H., M. Taniguchi, and J. Stein-Streilein, *Long-term survival of corneal allografts is dependent on intact CD1d-reactive NKT cells*. J Immunol, 2002. 168(4): p. 2028-34.
206. Beilke, J.N., et al., *NK cells promote islet allograft tolerance via a perforin-dependent mechanism*. Nat Med, 2005. 11(10): p. 1059-65.

207. Jiang, X., et al., *Mechanism of NKT cell-mediated transplant tolerance*. Am J Transplant, 2007. 7(6): p. 1482-90.
208. Chen, W., et al., *Infusion of in vitro-generated DN T regulatory cells induces permanent cardiac allograft survival in mice*. Transplant Proc, 2003. 35(7): p. 2479-80.
209. Young, K.J., et al., *Donor-lymphocyte infusion induces transplantation tolerance by activating systemic and graft-infiltrating double-negative regulatory T cells*. Blood, 2002. 100(9): p. 3408-14.
210. Chen, W., et al., *Role of double-negative regulatory T cells in long-term cardiac xenograft survival*. J Immunol, 2003. 170(4): p. 1846-53.
211. Zhang, Z.X., et al., *Double-negative T cells, activated by xenoantigen, lyse autologous B and T cells using a perforin/granzyme-dependent, Fas-Fas ligand-independent pathway*. J Immunol, 2006. 177(10): p. 6920-9.
212. McIver, Z., et al., *Double-negative regulatory T cells induce allotolerance when expanded after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation*. Br J Haematol, 2008. 141(2): p. 170-8.
213. Levey, A.S., et al., *A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group*. Ann Intern Med, 1999. 130(6): p. 461-70.
214. Johnson, D., *The CARI guidelines. Evaluation of renal function*. Nephrology (Carlton), 2005. 10 Suppl 4: p. S133-76.
215. Mestre, M., et al., *Longitudinal study of the frequency of cytotoxic T cell precursors in kidney allograft recipients*. Clin Exp Immunol, 1996. 104(1): p. 108-14.
216. Jiang, H. and L. Chess, *An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation*. J Clin Invest, 2004. 114(9): p. 1198-208.
217. Liu, Z., et al., *Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells*. Int Immunol, 1998. 10(6): p. 775-83.
218. Bestard, O., et al., *Achieving donor-specific hyporesponsiveness is associated with FOXP3+ regulatory T cell recruitment in human renal allograft infiltrates*. J Immunol, 2007. 179(7): p. 4901-9.
219. Noris, M., et al., *Regulatory T cells and T cell depletion: role of immunosuppressive drugs*. J Am Soc Nephrol, 2007. 18(3): p. 1007-18.
220. Joffre, O., et al., *Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes*. Nat Med, 2008. 14(1): p. 88-92.
221. Benghiat, F.S., et al., *Critical influence of natural regulatory CD25+ T cells on the fate of allografts in the absence of immunosuppression*. Transplantation, 2005. 79(6): p. 648-54.
222. Demirkiran, A., et al., *Impact of immunosuppressive drugs on CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells: does in vitro evidence translate to the clinical setting?* Transplantation, 2008. 85(6): p. 783-9.
223. Sakaguchi, S., *Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self*. Nat Immunol, 2005. 6(4): p. 345-52.
224. Loong, C.C., et al., *Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection*. J Pathol, 2002. 197(3): p. 322-32.
225. Veronese, F., et al., *Pathological and clinical correlates of FOXP3+ cells in renal allografts during acute rejection*. Am J Transplant, 2007. 7(4): p. 914-22.

226. Bestard, O., et al., *Presence of FoxP3+ regulatory T Cells predicts outcome of subclinical rejection of renal allografts*. J Am Soc Nephrol, 2008. 19(10): p. 2020-6.
227. Bestard, O., et al., *Circulating alloreactive T cells correlate with graft function in longstanding renal transplant recipients*. J Am Soc Nephrol, 2008. 19(7): p. 1419-29.
228. Pascual, M., et al., *Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation*. N Engl J Med, 2002. 346(8): p. 580-90.
229. Hariharan, S., M.A. McBride, and E.P. Cohen, *Evolution of endpoints for renal transplant outcome*. Am J Transplant, 2003. 3(8): p. 933-41.
230. Vincenti, F., *Immunosuppression minimization: current and future trends in transplant immunosuppression*. J Am Soc Nephrol, 2003. 14(7): p. 1940-8.
231. Ruiz, J.C., et al., *Early cyclosporine withdrawal in kidney-transplant recipients receiving sirolimus prevents progression of chronic pathologic allograft lesions*. Transplantation, 2004. 78(9): p. 1312-8.
232. Battaglia, M., A. Stabilini, and M.G. Roncarolo, *Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells*. Blood, 2005. 105(12): p. 4743-8.
233. Baan, C.C., et al., *Differential effect of calcineurin inhibitors, anti-CD25 antibodies and rapamycin on the induction of FOXP3 in human T cells*. Transplantation, 2005. 80(1): p. 110-7.
234. Valmori, D., et al., *Rapamycin-mediated enrichment of T cells with regulatory activity in stimulated CD4+ 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+ T cells*. J Immunol, 2006. 177(2): p. 944-9.
235. Salama, A.D., et al., *Regulatory CD25+ T cells in human kidney transplant recipients*. J Am Soc Nephrol, 2003. 14(6): p. 1643-51.
236. Fontenot, J.D. and A.Y. Rudensky, *A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3*. Nat Immunol, 2005. 6(4): p. 331-7.
237. Game, D.S., M.P. Hernandez-Fuentes, and R.I. Lechler, *Everolimus and basiliximab permit suppression by human CD4+CD25+ cells in vitro*. Am J Transplant, 2005. 5(3): p. 454-64.
238. Shimizu, J., et al., *Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance*. Nat Immunol, 2002. 3(2): p. 135-42.
239. Ma, A., et al., *Combined therapy of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells with low-dose sirolimus, but not calcineurin inhibitors, preserves suppressive function of regulatory T cells and prolongs allograft survival in mice*. Int Immunopharmacol, 2009. 9(5): p. 553-63.
240. Tian, L., et al., *Acceleration of apoptosis in CD4+CD8+ thymocytes by rapamycin accompanied by increased CD4+CD25+ T cells in the periphery*. Transplantation, 2004. 77(2): p. 183-9.
241. Iellem, A., et al., *Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells*. J Exp Med, 2001. 194(6): p. 847-53.
242. Hancock, W.W., *Chemokines and transplant immunobiology*. J Am Soc Nephrol, 2002. 13(3): p. 821-4.
243. Lee, I., et al., *Recruitment of Foxp3+ T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor*. J Exp Med, 2005. 201(7): p. 1037-44.

244. Gao, W., et al., *Targeting of the chemokine receptor CCR1 suppresses development of acute and chronic cardiac allograft rejection*. J Clin Invest, 2000. 105(1): p. 35-44.
245. Bensinger, S.J., et al., *Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4+CD25+ regulatory T cells*. J Immunol, 2004. 172(9): p. 5287-96.
246. Fontenot, J.D., et al., *A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells*. Nat Immunol, 2005. 6(11): p. 1142-51.
247. D'Cruz, L.M. and L. Klein, *Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling*. Nat Immunol, 2005. 6(11): p. 1152-9.
248. Shibutani, S., et al., *Effects of immunosuppressants on induction of regulatory cells after intratracheal delivery of alloantigen*. Transplantation, 2005. 79(8): p. 904-13.
249. Gregori, S., et al., *Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance*. J Immunol, 2001. 167(4): p. 1945-53.
250. Zeiser, R., et al., *Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production*. Blood, 2006. 108(1): p. 390-9.
251. Karagiannidis, C., et al., *Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2004. 114(6): p. 1425-33.
252. Fattorossi, A., et al., *Circulating and thymic CD4 CD25 T regulatory cells in myasthenia gravis: effect of immunosuppressive treatment*. Immunology, 2005. 116(1): p. 134-41.
253. Ciancio, G., et al., *A randomized trial of three renal transplant induction antibodies: early comparison of tacrolimus, mycophenolate mofetil, and steroid dosing, and newer immune-monitoring*. Transplantation, 2005. 80(4): p. 457-65.
254. Bestard, O., J.M. Cruzado, and J.M. Grinyo, *Calcineurin-inhibitor-sparing immunosuppressive protocols*. Transplant Proc, 2005. 37(9): p. 3729-32.
255. Grinyo, J.M., et al., *Pilot randomized study of early tacrolimus withdrawal from a regimen with sirolimus plus tacrolimus in kidney transplantation*. Am J Transplant, 2004. 4(8): p. 1308-14.
256. Mota, A., et al., *Sirolimus-based therapy following early cyclosporine withdrawal provides significantly improved renal histology and function at 3 years*. Am J Transplant, 2004. 4(6): p. 953-61.
257. Oberbauer, R., et al., *Health-related quality-of-life outcomes of sirolimus-treated kidney transplant patients after elimination of cyclosporine A: results of a 2-year randomized clinical trial*. Transplantation, 2003. 75(8): p. 1277-85.
258. Coenen, J.J., et al., *Rapamycin, and not cyclosporin A, preserves the highly suppressive CD27+ subset of human CD4+CD25+ regulatory T cells*. Blood, 2006. 107(3): p. 1018-23.
259. Gao, W., et al., *Contrasting effects of cyclosporine and rapamycin in de novo generation of alloantigen-specific regulatory T cells*. Am J Transplant, 2007. 7(7): p. 1722-32.
260. San Segundo, D., et al., *Reduced numbers of blood natural regulatory T cells in stable liver transplant recipients with high levels of calcineurin inhibitors*. Transplant Proc, 2007. 39(7): p. 2290-2.
261. Wang, Z., et al., *Short-term anti-CD25 monoclonal antibody administration down-regulated CD25 expression without eliminating the neogenetic functional regulatory T cells in kidney transplantation*. Clin Exp Immunol, 2009. 155(3): p. 496-503.

262. Bluestone, J.A., et al., *The effect of costimulatory and interleukin 2 receptor blockade on regulatory T cells in renal transplantation*. Am J Transplant, 2008. 8(10): p. 2086-96.
263. Kreijveld, E., et al., *Immunological monitoring of renal transplant recipients to predict acute allograft rejection following the discontinuation of tacrolimus*. PLoS One, 2008. 3(7): p. e2711.
264. Braudeau, C., et al., *Variation in numbers of CD4+CD25highFOXP3+ T cells with normal immuno-regulatory properties in long-term graft outcome*. Transpl Int, 2007. 20(10): p. 845-55.
265. Ruggenti, P., 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(8): p. 956-64.
266. Pascual, J., et al., *Calcineurin inhibitor withdrawal after renal transplantation with alemtuzumab: clinical outcomes and effect on T-regulatory cells*. Am J Transplant, 2008. 8(7): p. 1529-36.

9. ANEXO

9. ANEXO

9.1. Anexo I. Tablas de Resultados

Tabla 6. Frecuencias relativas de las diferentes subpoblaciones linfocitarias en pacientes trasplantados renales

Mediana (rango intercuartílico)		Meses post trasplante (n)					
		0 (n=38)	6 (n=36)	12 (n=38)	18 (n=34)	24 (n=35)	
Subpoblaciones generales	% Linfocitos	20,3 (16,8-26,8) ^{g,h}	25,8 (20,0-31,9)	26,2 (19,8-32,1)	24,1 (20,0-30,9)	23,4 (19,2-29,3)	
	% CD3 ⁺	67,8 (61,5-75,2) ^{c,j}	72,9 (61,8-79,0) ^e	74,1 (62,3-79,9)	73,0 (64,4-80,3)	74,9 (62,2-82,4)	
	%CD3αβ	96,8 (94,6-98,2) ^{g,h}	95,6 (92,1-97,0)	95,4 (92,9-97,3)	96,2 (93,2-97,5)	95,8 (93,3-97,5)	
	%CD3δγ	3,12 (1,77-5,39) ^{a,h}	3,75 (2,35-6,48)	4,34 (2,62-7,11)	3,74 (2,46-6,70)	3,99 (2,35-6,67)	
	% linfocitos T	% CD3 ⁺ CD4 ⁺	42,4 (36,6-49,8) ^{a,c,d,h}	38,9 (27,9-45,2)	37,0 (26,6-42,1)	36,9 (28,0-42,9)	36,5 (32,4-41,4)
	% CD3 ⁺ CD8 ⁺	18,9 (13,3-29,1) ^{a,i,j}	28,8 (20,2-35,5)	31,7 (19,6-39,2)	31,3 (23,0-41,5)	30,5 (23,1-39,0)	
	Ratio CD4/CD8	1,98 (1,27-3,26) ^{g,h,i,j}	1,30 (0,84-2,06)	1,20 (0,79-1,66)	1,15 (0,73-1,77)	1,12 (0,84-1,58)	
	% linfocitos B	% CD19 ⁺	6,19 (3,22-9,33) ^a	2,69 (1,75-6,42) ^{l,m}	5,11 (2,93-6,77) ⁿ	5,77 (3,43-8,63)	6,67 (3,44-11,28)
	% NK	% CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	12,6 (7,1-19,1)	9,8 (5,9-15,2)	13,5 (8,5-21,5)	12,2 (8,1-16,8)	14,1 (9,2-21,9)
	Tregs	% CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{high}	1,31 (0,69-2,47) ^{g,j}	0,60 (0,21-1,13) ^{k,l,m}	1,12 (0,68-2,28) ⁿ	2,49 (1,15-3,96) ^f	3,13 (2,69-4,41)
% CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD28 ⁻		39,0 (22,3-59,3) ^{h,i,j}	61,9 (33,4-68,6)	63,0 (44,9-79,0)	61,7 (40,9-72,6)	65,0 (45,4-76,3)	
% CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺		20,3 (7,4-36,5) ^b	27,6 (10,6-39,5)	33,5 (13,3-43,8)	25,0 (11,5-44,0)	18,1 (7,3-39,7)	

^a p<0,01 entre 0 – 6 meses % CD3,δγ CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD19⁺.

^b p<0,01 entre 0 – 12 meses % CD3⁻CD16⁺CD56⁺.

^c p<0,01 entre 0 – 18 meses % CD3⁺, CD3⁺CD4⁺.

^d p<0,01 entre 0 – 24 meses % CD3⁺CD4⁺.

^e p<0,01 entre 6 – 24 meses % CD3⁺.

^f p<0,01 entre 18 – 24 meses % CD3⁺CD4⁺CD25^{high}.

^g p<0,001 entre 0 – 6 meses % Linfocitos, CD3αβ, ratio 4/8 y CD3⁺CD4⁺CD25^{high}.

^h p<0,001 entre 0 – 12 meses % Linfocitos, CD3αβ, CD3γδ, CD3⁺CD4⁺, ratio 4/8, CD3⁺CD8⁺CD28⁻.

ⁱ p<0,001 entre 0 – 18 meses % CD3⁺CD8⁺, ratio 4/8, CD3⁺CD8⁺CD28⁻.

^j p<0,001 entre 0 – 24 meses % CD3⁺, CD3⁺CD8⁺, ratio 4/8, CD3⁺CD4⁺CD25^{high}, CD3⁺CD8⁺CD28⁻.

^k p<0,001 entre 6 – 12 meses % CD3⁺CD4⁺CD25^{high}.

^l p<0,001 entre 6 – 18 meses % CD19⁺, CD3⁺CD4⁺CD25^{high}.

^m p<0,001 entre 6 – 24 meses % CD19⁺, CD3⁺CD4⁺CD25^{high}.

ⁿ p<0,001 entre 12 – 24 meses % CD19⁺, CD3⁺CD4⁺CD25^{high}.

Tabla 7: Frecuencias absolutas de las subpoblaciones linfocitarias generales en pacientes trasplantados renales

Número absoluto/mm ³	Meses post trasplante (n)				
	0 (n=38)	6 (n=36)	12 (n=38)	18 (n=34)	24 (n=35)
Mediana (rango intercuartílico)					
Leucocitos	7200 (5950-9450) ^{c,d,g,h}	6050 (4800-7500)	6350 (5200-7225)	6350 (5550-7525)	6300 (5300-6700)
Linfocitos	1550 (1137-2119)	1476 (993-2145)	1692 (1143-2159)	1565 (1068-2119)	1534 (1112-1831)
Linfocitos T (CD3⁺)	1020 (745-1296)	1114 (681-1507)	1219 (833-1456)	1137 (732-1563)	1044 (752-1452)
CD3αβ	1000 (706-1225)	1085 (631-1388)	1177 (804-1378)	1107 (585-1537)	1026 (683-1351)
CD3γδ	28,5 (17,0-63,7) ^b	41 (23,4-52,7)	49,5 (28,7-76,7)	41,7 (23,0-83,2)	43,6 (23,6-77,8)
Linfocitos T CD4⁺	597 (457-924)	551 (351-748)	597 (347-781)	510 (311-808)	490 (358-682)
Linfocitos T CD8⁺	298 (203-467) ^{b,c}	388 (267-654)	516 (267-764)	556 (273-671)	447 (273-664)
Linfocitos B (CD19⁺)	79,0 (41,7-158,7)	39,5 (20,0-93,7) ^{f,m}	87,5 (43,5-127)	78,5 (45,5-140,6)	100 (52,0-185,1)
Linfocitos NK (CD3⁻CD16⁺CD56⁺)	157 (103,7-281,5)	121 (62,7-237,0)	234 (134,5-392,5)	158 (92,5-302,1)	204 (102-308)
CD3⁺CD4⁺CD25^{high}	8,18 (4,71-11,81) ^{c,g,j}	2,58 (0,99-6,48) ^{k,l}	5,36 (2,99-11,9) ⁿ	12,9 (4,6-22,9)	17,03 (11,7-24,8)
CD3⁺CD8⁺CD28⁻	100 (56,8-243) ^{a,h,i,j}	221 (97-379) ^e	297 (115-548)	302 (136-459)	291 (121-468)
CD3⁺CD16⁺CD56⁺	28,5 (10-54,2)	31,5 (15,5-48)	51 (21,8-120)	39 (18-60,6)	28,9 (15,5-67)

^a p<0,01 entre 0 – 6 meses n° de CD3⁺CD8⁺CD28⁻.

^b p<0,01 entre 0 – 12 meses n° de CD3γδ, CD3⁺CD8⁺.

^c p<0,01 entre 0 – 18 meses n° de leucocitos, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁺CD25^{high}.

^d p<0,01 entre 0 – 24 meses n° de leucocitos

^e p<0,01 entre 6 – 12 meses n° de CD3⁺CD8⁺CD28⁻.

^f p<0,01 entre 6 – 18 meses n° de CD19⁺.

^g p<0,001 entre 0 – 6 meses n° de leucocitos, CD3⁺CD4⁺CD25^{high}.

^h p<0,001 entre 0 – 12 meses n° de leucocitos, CD3⁺CD8⁺CD28⁻.

ⁱ p<0,001 entre 0 – 18 meses n° de CD3⁺CD8⁺CD28⁻.

^j p<0,001 entre 0 – 24 meses n° de CD3⁺CD4⁺CD25^{high}, CD3⁺CD8⁺CD28⁻.

^k p<0,001 entre 6 – 12 meses n° de CD3⁺CD4⁺CD25^{high}.

^l p<0,001 entre 6 – 18 meses n° de CD3⁺CD4⁺CD25^{high}.

^m p<0,001 entre 6 – 24 meses n° de CD19⁺.

ⁿ p<0,001 entre 12 – 24 meses n° de CD3⁺CD4⁺CD25^{high}.

Tabla 8: Frecuencia de subpoblaciones linfocitarias en pacientes trasplantados (Tx) y retransplantados (ReTx)

Meses post-trasplante		0		6		12		18		24		
Media (\pm DE)	(n)	Tx	ReTx	Tx	ReTx	Tx	ReTx	Tx	ReTx	Tx	ReTx	
		(27)	(11)	(24)	(12)	(27)	(11)	(24)	(10)	(24)	(11)	
Subpoblaciones generales	% Linfocitos	20,1 \pm 6,6	23,3 \pm 7,0	25,9 \pm 7,9	27,5 \pm 11,7	27,1 \pm 8,8	24,8 \pm 9,8	25,7 \pm 7,2	23,4 \pm 9,6	24,4 \pm 6,7	25,2 \pm 10,5	
	% CD3 ⁺	65,8 \pm 10,8	69,9 \pm 13,1	67,3 \pm 13,4	73,1 \pm 12,5	68,9 \pm 14,7	75,5 \pm 8,1	71,0 \pm 10,1	73,7 \pm 11,7	71,7 \pm 10,3	76,2 \pm 10,6	
	%CD3 $\alpha\beta$	96,4 \pm 2,5	94,8 \pm 3,4	95,2 \pm 3,1	91,4 \pm 7,6	95,0 \pm 4,1	92,3 \pm 4,9	94,9 \pm 5,6	93,1 \pm 5,5	95,3 \pm 4,2	92,3 \pm 5,7	
	% linfocitos T	% CD3 $\delta\gamma$	3,5 \pm 2,6	5,1 \pm 3,5	4,3 \pm 3,0	6,7 \pm 5,0	4,9 \pm 4,1	7,7 \pm 4,9	5,0 \pm 5,6	6,8 \pm 5,5	4,6 \pm 4,1	7,6 \pm 5,8
	% CD3 ⁺ CD4 ⁺	42,2 \pm 9,5	43,4 \pm 8,5	35,9 \pm 12,3	36,0 \pm 13,3	35,0 \pm 10,4	34,6 \pm 10,4	35,2 \pm 11,0	36,2 \pm 10,7	36,4 \pm 9,1	36,3 \pm 9,4	
	% CD3 ⁺ CD8 ⁺	21,2 \pm 9,1	23,4 \pm 9,8	27,5 \pm 11,2	30,5 \pm 8,3	30,6 \pm 14,6	34,1 \pm 10,1	31,6 \pm 14,5	35,9 \pm 12,0	30,8 \pm 12,8	34,5 \pm 9,9	
	Ratio CD4/CD8	2,5 \pm 1,5	2,3 \pm 1,3	1,6 \pm 0,9	1,3 \pm 0,6	1,5 \pm 1,1	1,1 \pm 0,5	1,5 \pm 1,1	1,2 \pm 0,6	1,5 \pm 1,0	1,1 \pm 0,5	
	% linfocitos B	% CD19 ⁺	7,2 \pm 3,7 ^a	4,2 \pm 3,5	5,0 \pm 3,4 ^b	2,3 \pm 2,0	6,1 \pm 3,6 ^c	3,6 \pm 1,8	7,1 \pm 3,8	4,7 \pm 3,9	8,1 \pm 4,4	5,5 \pm 4,2
	% NK	% CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	16,5 \pm 15,2	10,7 \pm 5,6	14,0 \pm 9,9 ^b	8,1 \pm 4,9	16,5 \pm 8,8 ^c	11,5 \pm 4,9	14,6 \pm 9,6	10,6 \pm 3,4	17,3 \pm 9,1 ^d	11,3 \pm 3,4
	Tregs	% CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{high}	1,9 \pm 1,4	1,2 \pm 0,8	0,7 \pm 0,5	0,8 \pm 0,8	1,9 \pm 1,7	1,3 \pm 1,1	2,4 \pm 1,5	2,9 \pm 1,8	3,7 \pm 1,6	3,5 \pm 0,9
% CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD28 ⁻		38,7 \pm 20,4	45,1 \pm 21,1	55,6 \pm 22,1	53,8 \pm 22,7	55,9 \pm 24,6	65,3 \pm 14,9	57,1 \pm 25,9	59,9 \pm 16,6	57,5 \pm 25,1	63,1 \pm 14,2	
% CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺		22,0 \pm 21,0	28,7 \pm 21,4	26,2 \pm 18,8	27,9 \pm 16,3	31,6 \pm 23,9	35,5 \pm 17,0	25,1 \pm 20,5	36,1 \pm 18,8	22,2 \pm 20,0	29,9 \pm 20,8	

DE: Desviación Estándar

^a p<0,05 en T=0 meses entre primer trasplante (Tx) y retransplante (ReTx).^b p<0,05 en T=6 meses entre primer trasplante (Tx) y retransplante (ReTx).^c p<0,05 en T=12 meses entre primer trasplante (Tx) y retransplante (ReTx).^d p<0,05 en T=24 meses entre primer trasplante (Tx) y retransplante (ReTx).

Tabla 9: Comparación del número absoluto de subpoblaciones linfocitarias generales en pacientes trasplantados renales (Tx) y retrasplantados (ReTx)

		Meses post-trasplante		0		6		12		18		24		
Media (\pm DE)		Tx	ReTx	Tx	ReTx	Tx	ReTx	Tx	ReTx	Tx	ReTx	Tx	ReTx	
(n)		(27)	(11)	(24)	(12)	(27)	(11)	(24)	(10)	(24)	(11)	(24)	(11)	
Subpoblaciones generales	Leucocitos	9111 \pm 3920 ^a	6155 \pm 913	6712 \pm 2287 ^c	5017 \pm 1734	6744 \pm 1788 ^d	5445 \pm 1542	6554 \pm 1789	6160 \pm 1378	6508 \pm 1812	5736 \pm 904			
	Linfocitos	1784 \pm 821	1420 \pm 450	1734 \pm 780	1286 \pm 579	1794 \pm 617	1432 \pm 776	1674 \pm 619	1433 \pm 677	1545 \pm 490	1433 \pm 599			
	CD3 ⁺	1167 \pm 591	967 \pm 281	1185 \pm 564	928 \pm 429	1236 \pm 497	1094 \pm 618	1191 \pm 459	1066 \pm 562	1102 \pm 356	1084 \pm 466			
	Linfocitos T	CD3 $\alpha\beta$	1129 \pm 587	915 \pm 261	1134 \pm 550	861 \pm 427	1181 \pm 488	1024 \pm 604	1137 \pm 458	1004 \pm 553	1055 \pm 354	1006 \pm 451		
		CD3 $\delta\gamma$	39,8 \pm 30,5	51 \pm 40,3	44,7 \pm 36,8	56,2 \pm 40,8	53,1 \pm 32	70 \pm 47,5	52,9 \pm 48,5	61,7 \pm 34,9	45,6 \pm 33,3 ^f	77 \pm 52,6		
		CD3 ⁺ CD4 ⁺	756 \pm 406	597 \pm 156	647 \pm 394	448 \pm 202	631 \pm 288	487 \pm 269	595 \pm 305	492 \pm 234	566 \pm 240	492 \pm 198		
		CD3 ⁺ CD8 ⁺	377 \pm 252	331 \pm 165	494 \pm 302	395 \pm 242	559 \pm 301	504 \pm 454	531 \pm 292	555 \pm 438	474 \pm 243	518 \pm 337		
	Linfocitos B	CD19 ⁺	120,2 \pm 81 ^b	57 \pm 48,1	86,6 \pm 72,3 ^c	28,7 \pm 28,6	100 \pm 51,7 ^d	54 \pm 44,7	113 \pm 67,3	80,9 \pm 96,3	122 \pm 68,1	93,3 \pm 95		
	NK	CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	251 \pm 200	155 \pm 106	242 \pm 230 ^c	91,7 \pm 65	291 \pm 152 ^d	161 \pm 108	247 \pm 198 ^e	147 \pm 77,6	277 \pm 201	165 \pm 80		
	Tregs	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{high}	12,9 \pm 12,0	7,03 \pm 6,06	4,1 \pm 3,48	3,12 \pm 3,61	12,1 \pm 14,9	6,9 \pm 9,2	17,02 \pm 15,3	15,1 \pm 13,2	19,9 \pm 10,8	17,1 \pm 8,3		
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD28 ⁻		169 \pm 172	173 \pm 137	290 \pm 221	196 \pm 100	351 \pm 268	366 \pm 352	343 \pm 269	379 \pm 405	305 \pm 244	359 \pm 302			
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺		44,8 \pm 65,3	53,5 \pm 59,5	51,5 \pm 55,6	27 \pm 20,05	97 \pm 118	59 \pm 49	46,5 \pm 43,2	51,7 \pm 39,8	54,5 \pm 68,8	50,1 \pm 43,9			

DE: Desviación Estándar

^a p<0,01 en T=0 meses entre primer trasplante (Tx) y retrasplante (ReTx).

^b p<0,05 en T=0 meses entre Tx y ReTx.

^c p<0,05 en T=6 meses entre Tx y ReTx.

^d p<0,05 en T=12 meses entre Tx y ReTx.

^e p<0,05 en T=18 meses entre Tx y ReTx.

^f p<0,05 en T=24 meses entre Tx y ReTx.

Tabla 10: Frecuencia de subpoblaciones linfocitarias en pacientes trasplantados (Tx) y pacientes que sufre necrosis tubular aguda (NTA)

Meses post-trasplante		0		6		12		18		24		
		Tx	NTA	Tx	NTA	Tx	NTA	Tx	NTA	Tx	NTA	
Media (\pm DE)	(n)	(32)	(6)	(29)	(7)	(31)	(7)	(28)	(6)	(29)	(6)	
Subpoblaciones generales	% Linfocitos	22,3 \pm 6,2 ^a	14,5 \pm 6,2	28,2 \pm 8,5 ^b	19,5 \pm 9,2	27,8 \pm 8,8	20,7 \pm 7,9	26,0 \pm 7,4	20,1 \pm 9,0	25,5 \pm 7,9	20,3 \pm 7,2	
		% CD3 ⁺	67,3 \pm 12,2	64,8 \pm 6,1	71,5 \pm 10,5 ^b	60,0 \pm 19,3	71,0 \pm 14,0	69,9 \pm 10,6	72,6 \pm 10,3	67,9 \pm 11,2	73,7 \pm 10,9	70,5 \pm 8,7
		%CD3 $\alpha\beta$	95,7 \pm 3,0	97,0 \pm 1,3	93,7 \pm 5,6	94,6 \pm 4,1	94,3 \pm 4,5	93,7 \pm 4,6	94,1 \pm 6,0	95,5 \pm 3,3	94,0 \pm 5,1	96,0 \pm 3,0
		%CD3 $\delta\gamma$	4,2 \pm 3,1	2,9 \pm 1,4	5,1 \pm 4,0	5,1 \pm 4,0	5,6 \pm 4,5	6,2 \pm 4,6	5,7 \pm 5,9	4,4 \pm 3,3	5,8 \pm 5,1	3,9 \pm 3,0
	% linfocitos T	% CD3 ⁺ CD4 ⁺	42,3 \pm 9,6	43,9 \pm 6,5	37,1 \pm 12,4	30,9 \pm 12,7	34,9 \pm 10,1	35,1 \pm 11,8	35,3 \pm 10,9	36,6 \pm 11,0	35,6 \pm 8,9	40,0 \pm 10,1
		% CD3 ⁺ CD8 ⁺	22,2 \pm 9,3	19,9 \pm 9,8	28,5 \pm 7,5	28,5 \pm 18,9	31,8 \pm 12,3	30,7 \pm 18,9	34,3 \pm 12,7	26,4 \pm 18,2	32,9 \pm 11,5	27,4 \pm 14,3
		Ratio CD4/CD8	2,4 \pm 1,5	2,7 \pm 1,3	1,4 \pm 0,7	1,7 \pm 1,2	1,3 \pm 0,7	1,9 \pm 1,6	1,2 \pm 0,8	2,4 \pm 1,3	1,3 \pm 0,7	1,9 \pm 1,2
	% linfocitos B	% CD19 ⁺	6,0 \pm 3,8	8,1 \pm 3,9	3,7 \pm 2,7	5,9 \pm 4,6	5,2 \pm 3,3	6,2 \pm 4,2	6,0 \pm 3,4	8,2 \pm 5,8	6,8 \pm 4,0	9,7 \pm 6,0
	% NK	% CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	12,4 \pm 8,1	27,9 \pm 25,8	11,4 \pm 9,1	14,7 \pm 8,7	14,5 \pm 8,4	17,3 \pm 7,2	12,8 \pm 8,3	16,5 \pm 8,4	15,2 \pm 8,5	16,3 \pm 7,2
	Tregs	% CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{high}	1,6 \pm 1,3	2,5 \pm 1,3	0,7 \pm 0,6	1,0 \pm 0,7	1,8 \pm 1,6	1,7 \pm 1,1	2,4 \pm 1,6	3,0 \pm 1,4	3,6 \pm 1,5	3,6 \pm 0,8
% CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD28 ⁻		41,5 \pm 19,9	35,1 \pm 24,6	54,0 \pm 21,1	59,6 \pm 27,8	58,1 \pm 22,6	61,0 \pm 23,3	58,0 \pm 24,0	57,6 \pm 21,8	59,3 \pm 22,2	58,7 \pm 24,2	
% CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺		23,2 \pm 18,3	27,6 \pm 34,4	26,9 \pm 19,1	26,4 \pm 12,3	35,1 \pm 23,1	22,4 \pm 12,5	30 \pm 21,7 ^c	18,6 \pm 7,0	26,5 \pm 21,5	15,5 \pm 9,4	

DE: Desviación Estándar

^a p<0,05 en T=0 meses entre pacientes trasplantados (Tx) y con necrosis tubular aguda (NTA).^b p<0,05 en T=6 meses entre pacientes trasplantados (Tx) y con necrosis tubular aguda (NTA).^c p<0,05 en T=18 meses entre pacientes trasplantados (Tx) y con necrosis tubular aguda (NTA).

Tabla 11: Números absolutos de subpoblaciones generales en pacientes trasplantados (Tx) y pacientes que sufren necrosis tubular aguda (NTA)

Meses post-trasplante		0		6		12		18		24		
		Tx (32)	NTA (6)	Tx (29)	NTA (7)	Tx (31)	NTA (7)	Tx (28)	NTA (6)	Tx (29)	NTA (6)	
Subpoblaciones generales	Media (\pm DE)	(n)										
		Leucocitos	8584 \pm 3810 ^a	6500 \pm 919	6138 \pm 2339	6186 \pm 1964	6703 \pm 1702 ^d	4886 \pm 1544	6536 \pm 1796	5983 \pm 799	6210 \pm 1542	6533 \pm 2054
		Linfocitos	1817 \pm 708 ^a	939 \pm 474	1685 \pm 732	1170 \pm 682	1834 \pm 631 ^d	1048 \pm 496	1687 \pm 624	1212 \pm 586	1557 \pm 520	1282 \pm 504
	Linfocitos T	CD3 ⁺	1206 \pm 506 ^a	597 \pm 278	1183 \pm 471	753 \pm 661	1297 \pm 507 ^d	743 \pm 393	1216 \pm 458	867 \pm 553	1134 \pm 380	917 \pm 399
		CD3 $\alpha\beta$	1159 \pm 506 ^a	580 \pm 273	1120 \pm 468	726 \pm 654	1233 \pm 502 ^d	707 \pm 384	1155 \pm 460	834 \pm 545	1071 \pm 377	886 \pm 399
		CD3 $\delta\gamma$	48,1 \pm 34,0 ^b	16,1 \pm 8,5	53,9 \pm 40,1	26,6 \pm 14,4	62,8 \pm 38,2	36,4 \pm 24,3	60,4 \pm 46,9	32,8 \pm 21,8	60,7 \pm 44	30,4 \pm 19,2
		CD3 ⁺ CD4 ⁺	763 \pm 351 ^a	427 \pm 259	628 \pm 354	385 \pm 289	639 \pm 280 ^d	387 \pm 224	588 \pm 288	454 \pm 275	543 \pm 206	539 \pm 337
		CD3 ⁺ CD8 ⁺	401 \pm 229 ^a	167 \pm 90,5	484 \pm 249	367 \pm 410	593 \pm 346	323 \pm 273	576 \pm 315	364 \pm 397	519 \pm 279	337 \pm 186
	Linfocitos B	CD19 ⁺	107 \pm 81,6	73,6 \pm 50,7	69,4 \pm 70,6	58,6 \pm 51,4	92,5 \pm 54,1	62,3 \pm 46,6	107 \pm 78,8	86,8 \pm 71,3	114 \pm 82	111 \pm 57,6
	Células NK	CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	226 \pm 192	207 \pm 122	201 \pm 221	157 \pm 102	270 \pm 155	177 \pm 112	220 \pm 187	199 \pm 103	248 \pm 189	211 \pm 126
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{high}		11,5 \pm 11,6	9,5 \pm 6,02	3,94 \pm 3,74	3,08 \pm 2,39	11,8 \pm 14,7	5,43 \pm 4,39	16,8 \pm 15,2	15,1 \pm 12	19,3 \pm 10,3	18,0 \pm 9,1	
Tregs	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD28 ⁻	110 \pm 166 ^c	64,5 \pm 60,3	276 \pm 191	168 \pm 188	385 \pm 299	224 \pm 218	379 \pm 316	242 \pm 278	344 \pm 274	214 \pm 155	
	CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	46,0 \pm 60,0	54,4 \pm 85,0	43,2 \pm 49,1	44 \pm 46,5	97,6 \pm 111,4 ^e	35,7 \pm 22,8	50,6 \pm 44,4	33,8 \pm 16,9	58,7 \pm 66,2 ^f	25,9 \pm 8,7	

DE: Desviación Estándar

^a p<0,05 en T=0 meses entre pacientes trasplantados (Tx) y con necrosis tubular aguda (NTA).

^b p<0,001 en T=0 meses entre Tx y NTA.

^c p<0,01 en T=0 meses entre Tx y NTA.

^d p<0,05 en T=12 meses entre Tx y NTA.

^e p<0,01 en T=12 meses entre Tx y NTA.

^f p<0,05 en T=24 meses entre Tx y NTA.

Tabla 12: Frecuencia de las subpoblaciones linfocitarias en pacientes trasplantados (Tx) y pacientes que sufren un episodio de rechazo agudo (RA)

Meses post-trasplante		0		6		12		18		24		
		Tx	RA	Tx	RA	Tx	RA	Tx	RA	Tx	RA	
Media (\pm DE)	(n)	(26)	(12)	(25)	(11)	(26)	(12)	(23)	(11)	(24)	(11)	
Subpoblaciones generales	% Linfocitos	20,8 \pm 7,3	21,7 \pm 5,7	27,4 \pm 9,0	24,4 \pm 9,7	28,4 \pm 9,1 ^a	22,3 \pm 7,4	27,4 \pm 7,5 ^b	19,9 \pm 6,2	27,4 \pm 7,5 ^c	19,9 \pm 6,2	
	% CD3 ⁺	67,1 \pm 12,5	66,7 \pm 9,1	72,0 \pm 9,3	62,9 \pm 18,5	72,8 \pm 10,3	66,6 \pm 18,1	73,9 \pm 8,9	67,4 \pm 12,6	73,9 \pm 8,9	67,4 \pm 12,6	
	%CD3 $\alpha\beta$	95,9 \pm 3,0	96,0 \pm 2,5	94,3 \pm 4,1	92,9 \pm 7,4	94,5 \pm 3,8	93,5 \pm 5,8	94,9 \pm 4,2	93,2 \pm 7,8	94,9 \pm 4,2	93,2 \pm 7,8	
	%CD3 $\delta\gamma$	4,0 \pm 3,1	3,9 \pm 2,6	5,4 \pm 4,3	4,4 \pm 3,0	5,4 \pm 3,8	6,4 \pm 5,7	5,0 \pm 4,2	6,7 \pm 7,8	5,0 \pm 4,2	6,7 \pm 7,8	
	% linfocitos T	% CD3 ⁺ CD4 ⁺	41,8 \pm 9,5	44,3 \pm 8,4	37,6 \pm 11,3	32,1 \pm 14,8	35,8 \pm 8,1	32,8 \pm 14,1	36,5 \pm 9,0	33,5 \pm 14,0	36,5 \pm 9,0	33,5 \pm 14,0
	% CD3 ⁺ CD8 ⁺	23,0 \pm 9,0	19,4 \pm 9,7	30,0 \pm 10,4	25,0 \pm 9,6	33,5 \pm 11,2	27,5 \pm 17,1	33,9 \pm 12,4	30,8 \pm 16,8	33,9 \pm 12,4	30,8 \pm 16,8	
	Ratio CD4/CD8	2,2 \pm 1,2	3,0 \pm 1,8	1,5 \pm 0,8	1,5 \pm 0,9	1,3 \pm 0,6	1,7 \pm 1,4	1,3 \pm 0,7	1,6 \pm 1,3	1,3 \pm 0,7	1,6 \pm 1,3	
	% linfocitos B	% CD19 ⁺	6,2 \pm 4,0	6,5 \pm 3,7	3,9 \pm 2,9	4,6 \pm 4,0	4,8 \pm 2,5	6,8 \pm 4,6	6,2 \pm 3,9	6,8 \pm 4,1	6,2 \pm 3,9	6,8 \pm 4,1
	% NK	% CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	15,2 \pm 15,1	14,0 \pm 8,8	12,8 \pm 9,0	10,1 \pm 8,5	14,9 \pm 8,3	15,3 \pm 8,1	13,1 \pm 7,6	14,0 \pm 10,2	13,1 \pm 7,6	14,0 \pm 10,2
	Tregs	% CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{high}	1,8 \pm 1,4	1,6 \pm 1,0	0,8 \pm 0,6	0,6 \pm 0,5	1,9 \pm 1,6	1,4 \pm 1,2	2,7 \pm 1,7	2,2 \pm 1,4	2,7 \pm 1,7	2,2 \pm 1,4
% CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD28 ⁻		42,0 \pm 20,8	37,2 \pm 20,2	58,8 \pm 18,4	46,6 \pm 27,4	62,1 \pm 20,3	51,2 \pm 25,7	60,0 \pm 21,4	53,9 \pm 27,2	60,0 \pm 21,4	53,9 \pm 27,2	
% CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺		24,6 \pm 22,4	22,4 \pm 18,8	30,4 \pm 18,4	18,7 \pm 14,1	33,1 \pm 23,9	31,9 \pm 17,8	30,4 \pm 21,8	24,0 \pm 17,2	30,4 \pm 21,8	24,0 \pm 17,2	

DE: Desviación Estándar

^a p<0,05 en T=12 meses entre pacientes trasplantados (Tx) y trasplantados que sufren un episodio de rechazo agudo (RA).^b p<0,05 en T=18 meses entre Tx y RA.^c p<0,05 en T=24 meses entre Tx y RA.

Tabla 13: Números absolutos de las subpoblaciones linfocitarias en pacientes trasplantados (Tx) y pacientes que sufren un episodio de rechazo agudo.

Meses post-trasplante		0		6		12		18		24		
Media (\pm DE)	(n)	Tx (26)	RA (12)	Tx (25)	RA (11)	Tx (26)	RA (12)	Tx (23)	RA (11)	Tx (24)	RA (11)	
Subpoblaciones generales	Leucocitos	8827 \pm 4134	7017 \pm 1411	6504 \pm 2374	5336 \pm 1751	6585 \pm 1922	5900 \pm 1472	6583 \pm 1800	6345 \pm 1426	6117 \pm 1749	6591 \pm 1269	
	Linfocitos	1754 \pm 845	1516 \pm 454	1731 \pm 764	1251 \pm 592	1856 \pm 664 ^b	1327 \pm 572	1772 \pm 654 ^c	1251 \pm 438	1593 \pm 530	1328 \pm 471	
	CD3 ⁺	1164 \pm 609	991 \pm 247	1234 \pm 516 ^a	795 \pm 450	1332 \pm 476 ^b	900 \pm 539	1297 \pm 480 ^c	856 \pm 359	1172 \pm 379	932 \pm 368	
	CD3 $\alpha\beta$	1122 \pm 606	949 \pm 228	1172 \pm 507 ^a	750 \pm 450	1267 \pm 470 ^b	851 \pm 530	1239 \pm 474 ^c	804 \pm 367	1110 \pm 370	885 \pm 376	
	CD3 $\delta\gamma$	44,4 \pm 33,6	40,2 \pm 34,5	57,6 \pm 41,7 ^a	28 \pm 14,3	62,7 \pm 38,3	47,6 \pm 34,3	57,4 \pm 34,4	51,6 \pm 62,7	59,8 \pm 41,6	46,1 \pm 44,0	
	CD3 ⁺ CD4 ⁺	730 \pm 406	666 \pm 225	658 \pm 360 ^a	405 \pm 273	665 \pm 246 ^b	435 \pm 312	628 \pm 248	432 \pm 327	580 \pm 186	461 \pm 291	
	CD3 ⁺ CD8 ⁺	402 \pm 255	280 \pm 133	524 \pm 288 ^a	319 \pm 225	609 \pm 336	400 \pm 340	607 \pm 354	394 \pm 244	519 \pm 268	419 \pm 280	
	Linfocitos B	CD19 ⁺	107 \pm 88,6	90,1 \pm 49,0	73 \pm 73,2	54,4 \pm 49,9	89,0 \pm 53,4	82,6 \pm 56,0	114,1 \pm 85,5	82,1 \pm 51,7	126,9 \pm 84,2	83,6 \pm 51,3
	Células NK	CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	225,7 \pm 194	218,2 \pm 160	208,0 \pm 192	155,6 \pm 232	272 \pm 155,5	205,2 \pm 136	233,4 \pm 183	180 \pm 159	259 \pm 192	202,9 \pm 147
	Tregs	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{high}	12,06 \pm 12,76	9,34 \pm 4,81	4,49 \pm 3,7	2,15 \pm 2,42	13,31 \pm 15,6 ^b	4,71 \pm 3,76	19,31 \pm 15,63	10,5 \pm 10,4	20,01 \pm 8,31	16,9 \pm 13,2
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD28 ⁻		194 \pm 179	118 \pm 99	297 \pm 181	172 \pm 195	404 \pm 280	251 \pm 296	403 \pm 327	257 \pm 260	340 \pm 240	282 \pm 309	
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺		47,6 \pm 66,6	46,7 \pm 57,3	52 \pm 54,04	23,6 \pm 20,4	93,7 \pm 112	67,4 \pm 80,9	51,9 \pm 43,8	39,1 \pm 36,9	59,3 \pm 68,0	39,6 \pm 43,8	

DE: Desviación Estándar

^a p<0,05 en T=6 meses entre pacientes trasplantados (Tx) y trasplantados que sufren un episodio de rechazo agudo (RA).

^b p<0,05 en T=12 meses entre Tx y RA.

^c p<0,05 en T=18 meses entre Tx y RA.

Tabla 14. Características demográficas, clínicas e inmunológicas de los pacientes trasplantados renales en función del tratamiento de inducción.

Media±Desviación Estándar	Pacientes sin inducción	Timoglobulina	Anti-CD25
n	26	2	11
Edad del donante (años)	46,7±18,9	59±2,8	59,3±15
Edad del Receptor (años)	49,1±12,8	55,5±7,8	55,9±14,6
Anticuerpos máximo	2,16±8,3	15±21,2	0
Anticuerpos actuales	6,2±10,3	34,5±48,8	0
Incompatibilidades (media) A/B/DR	1,35/1,5/1,15	0,5/1,5/1,5	1,2/1,4/1
Número de trasplante previos (0/1/2/3)	16/8/1/1	0/2/0/0	11/0/0/0
Desarrollo de Necrosis Tubular Aguda (%)	15,4	50	18,2
Rechazo Agudo (%)	30,8	50	27,3
Retrasplante (%)	38,5	100	0

Tabla 15: Frecuencias relativas de subpoblaciones linfocitarias en pacientes trasplantados renales en función del tratamiento de inducción.

mes	Tratamiento (n)	Subpoblaciones Generales								Tregs		
		% Linfocitos	% CD4 ⁺	% CD8 ⁺	% CD19 ⁺	% CD16 ⁺ CD56 ⁺	% CD3 ⁺	CD3αβ	CD3γδ	% CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{high}	% NKT	% CD8 ⁺ CD28 ⁻
0	Timo (1)	14,9	51,3	12,6	5,3	13,1	71,5	95,6	4,4	1,6	20,4	12,8
	CD25 (11)	22,4±5,2	42,9±13,9	20,2±9,1	7,1±4,6	14,4±11,4	63,7±14,6	96,9±2,3	3,0±2,4	1,5±0,9	16,8±14,0	43,7±18,7
	No (26)	20,7±7,4	42,1±6,6	22,9±9,3	6,0±3,6	15,1±14,5	68,2±10,0	95,6±3,1	4,3±3,1	1,8±1,5	27,1±23,4	40,2±21,1
6	Timo (2)	11,5±6,1 ^{ab}	30,5±19,9	33,7±21,2	3,9±2,8	12,1±1,5	71,7±2,1	90,6±3,7 ^b	9,2±3,7 ^c	1,5±1,0	16,3±11,5	62,3±37,9
	CD25 (9)	26,2±6,8	37,5±12,7	28,3±12,5	4,3±3,2	13,6±9,5	68,4±18,4	96,2±2,6	3,6±2,5	0,8±0,4	26,1±23,4	57,0±20,6
	No (25)	27,8±9,3	35,8±12,4	28,2±9,0	4,1±3,4	11,4±9,3	69,4±11,9	93,3±5,9	5,3±4,2	0,6±0,6	27,9±16,3	53,8±22,2
12	Timo (2)	11,5±1,9 ^c	28,1±14,3	33,6±13,3	4,1±0,2	11,8±2,7	71,8±0,3	88,3±3,5 ^b	11,7±3,6 ^c	1,7±0,5	24,4±15,7	66,0±28,7
	CD25 (11)	25,9±9,9	33,7±10,6	29,4±16,1	6,0±4,5	16,5±8,1	66,1±19,6	94,9±5,7	4,9±5,7	1,8±1,9	28,3±26,1	60,3±23,1
	No (25)	27,9±7,9	36,0±10,1	32,5±12,6	5,2±3,0	14,7±8,5	72,8±10,0	94,3±3,7	5,6±3,7	1,7±1,5	35,4±20,7	57,3±22,6
18	Timo (1)	13,2	35	30,3	4,7	10,3	73,5	92,7	7,3	1,7	6,8	37
	CD25 (9)	26,1±7,6	33,7±10,5	33,2±15,8	6,0±3,4	16,4±10,7	72,1±12,9	93,7±8,6	6,1±8,5	2,8±1,6	32,0±27,4	61,2±27,2
	No (24)	25,1±7,9	36,2±11,2	32,9±13,6	6,6±4,2	12,3±7,3	71,6±10,0	94,7±4,3	5,2±4,3	2,5±1,6	27,9±17,5	57,7±22,4
24	Timo (1)	13,5	38,3	28,3	6,7	8,3	67,5	94,3	5,7	3,9	0	46,3
	CD25 (10)	25,6±4,4	37,0±9,9	29,9±12,5	7,9±4,7	18,8±9,2	71,4±12,2	95,0±5,9	4,8±5,6	4,2±2,1	25,6±24,1	59,4±24,2
	No (24)	24,7±8,9	36,1±9,1	33,0±12,1	7,1±4,5	14,3±7,6	74,1±10,0	94,1±4,6	5,8±4,6	3,3±1,0	25,2±18,8	59,7±22,2

^a p<0,05 entre los tratamientos con Timoglobulina (Timo) y sin inducción (No) a los 6 meses del trasplante.

^b p<0,05 entre los tratamientos con TG y con anti-CD25 (CD25) a los 6 meses del trasplante.

^c p<0,05 entre los tratamientos con TG y sin inducción a los 12 meses del trasplante.

Tabla 16: Frecuencias absolutas de subpoblaciones linfocitarias en pacientes trasplantados renales en función del tratamiento de inducción.

mes	Tratamiento (n)	Subpoblaciones Generales									Tregs		
		Leucocitos	Linfocitos	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD19 ⁺	CD16 ⁺ CD56 ⁺	CD3 ⁺	CD3αβ	CD3γδ	CD4 ⁺ CD25 ^{high}	NKT	CD8 ⁺ CD28 ⁻
0	Timo (1)	7600	1132	581	143	60	149	810	774	35	9,3	30	18
	CD25 (11)	9173±3057	2047±799	886±483	410±271	145±106	280±256	1303±659	1266±662	35,1±26,3	12,7±10,3	27,0±22,1	214±208
	No (26)	7892±3845	1544±691	640±276	352±213	85,3±57,4	202±144	1039±456	994±446	46,7±36,6	10,6±11,5	56,6±73,5	157±138
6	Timo (2)	6100±424	691±320 ^a	242±235	198±38,9 ^a	22,5±6,4	81,0±28,3	492±216	450±213	41,5±2,1	2,4±1,1	11,5±4,9	131±99,7
	CD25 (9)	7456±2661	1891±589	704±265	587±374	79,8±60,8	270±237	1345±575	1295±559	48,4±38,1	5,5±3,2	45,6±34,3	339±268
	No (25)	5680±2027	1545±762	563±374	437±242	66,4±71	173±194	1060±494	1000±487	49,2±40,2	3,3±3,6	45,1±53,5	242±165
12	Timo (2)	3500±1980 ^{b,c}	422±293 ^{b,c}	139±142 ^c	122±43,1 ^b	17,5±13,4	45,5±23,3 ^d	302±209 ^c	271±195 ^c	31,5±13,4	2,1±1,8	9,0±1,4	75±7,1 ^b
	CD25 (11)	6827±1485	1743±615	594±289	554±361	92,5±52,4	291±154	1178±609	1129±597	47,3±34,5	10,7±14,5	77,5±97,6	391±309
	No (25)	6396±1771	1767±635	628±268	572±339	90,1±53,3	253±146	1274±451	1208±447	64,8±38,5	11,2±13,8	95,4±109	362±287
18	Timo (1)	5900	781	273	237	37	80	574	532	42	4,6	5	88
	CD25 (9)	6011±1596	1549±540	512±240	556±381	90,1±61,3	245±181	1147±522	1083±522	63±69,5	18,1±18,4	58±59	430±343
	No (24)	6621±1728	1658±667	596±303	544±325	112±82,7	212±178	1182±479	1128±475	53,4±33,7	16,4±13,4	46,1±33,5	340±304
24	Timo (1)	5800	783	300	222	52	65	528	498	30	11,7	0	103
	CD25 (10)	6150±1942	1524±377	584±273	443±200	125,2±76	277±143	1085±330	1037±337	46,7±40,9	22,5±10,6	55,4±56,5	291±167
	No (24)	6333±1529	1534±567	535±209	517±298	111±80	235±193	1125±404	1063±396	60,2±43,6	17,9±9,8	54,3±64,8	344±287

^a p<0,05 entre los tratamientos con Timoglobulina (Timo) y con anti-CD25 (CD25) a los 6 meses del trasplante.

^b p<0,05 entre los tratamientos con Timoglobulina (Timo) y con anti-CD25 (CD25) a los 12 meses del trasplante.

^c p<0,05 entre los tratamientos con Timoglobulina (Timo) y sin tratamiento (No) a los 12 meses del trasplante.

^d p<0,01 entre los tratamientos con Timoglobulina (Timo) y con anti-CD25 (CD25) a los 12 meses del trasplante.

Tabla 17: Frecuencias absolutas de subpoblaciones linfocitarias en pacientes trasplantados renales en función del tratamiento de mantenimiento en cada punto de control

mes	Tratamiento (n)	Leucocitos	Linfocitos	Subpoblaciones Generales							Tregs		
				CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD19 ⁺	CD16 ⁺ CD56 ⁺	CD3 ⁺	CD3 $\alpha\beta$	CD3 $\gamma\delta$	CD4 ⁺ CD25 ^{high}	NKT	CD8 ⁺ CD28 ⁻
0	CNI (35)	8285 \pm 3716	1636 \pm 754	703 \pm 354	387 \pm 306	97,1 \pm 71,2	224 \pm 181	1100 \pm 526	1057 \pm 522	43,8 \pm 34,0	11,6 \pm 11,2	49,2 \pm 64,7	168 \pm 157
	RAPA (3)	7900 \pm 1757	2175 \pm 463	782 \pm 468	361 \pm 227	159 \pm 145	216 \pm 235	1220 \pm 607	1184 \pm 597	34,7 \pm 31,5	7,1 \pm 4,1	25,3 \pm 38,7	194 \pm 246
6	CNI(36)	6147 \pm 2244	1584 \pm 742	580 \pm 352	461 \pm 284	67,3 \pm 66,8	192 \pm 203	1010 \pm 531	1043 \pm 523	48,6 \pm 38,0	3,78 \pm 3,50	43,3 \pm 47,9	258 \pm 192
	RAPA (0)												
12	CNI (35)	6389 \pm 1862	1663 \pm 678	585 \pm 292	525 \pm 348	85,0 \pm 54,0	247 \pm 153	1164 \pm 530	1107 \pm 521	56,4 \pm 38,5	10,9 \pm 14,1	75,3 \pm 99,0	360 \pm 302
	RAPA (3)	6133 \pm 1012	1993 \pm 705	680 \pm 218	747 \pm 305	110 \pm 51	313 \pm 142	1558 \pm 458	1479 \pm 451	75,7 \pm 8,5	7,4 \pm 3,5	206 \pm 84,1	304 \pm 64,0
18	CNI (31)	6442 \pm 1707	1573 \pm 636	564 \pm 288	527 \pm 340	101 \pm 80,0	218 \pm 181	1134 \pm 484	1084 \pm 475	49,0 \pm 33,2	17,1 \pm 15,0	43,7 \pm 38,1	354 \pm 324
	RAPA (3)	6400 \pm 1480	1920 \pm 671	566 \pm 332	659 \pm 304	135 \pm 11,9	213 \pm 132	1367 \pm 566	1243 \pm 654	123 \pm 93,6	9,5 \pm 7,2	91,8 \pm 59,6	352 \pm 125
24	CNI (30)	6203 \pm 1456	1529 \pm 542	553 \pm 235	500 \pm 283	110 \pm 76,7	248 \pm 186	1114 \pm 399	1063 \pm 387	49,4 \pm 37,1	18,9 \pm 10,3	49,5 \pm 62,9	336 \pm 274
	RAPA (4)	7275 \pm 2439	1542 \pm 234	515 \pm 195	475 \pm 182	168 \pm 53,0	236 \pm 133	1072 \pm 312	990 \pm 332	79,0 \pm 57,1	21,5 \pm 9,1	86,0 \pm 52,3	269 \pm 131

No se observan diferencias significativas en ninguna subpoblación en función de recibir tratamiento de mantenimiento con CNI (inhibidores de calcineurina) y RAPA (Rapamicina).

9.2 Anexo II. Publicaciones derivadas de esta tesis:

1. Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in renal transplant recipients.

Segundo DS, Ruiz JC, Izquierdo M, Fernández-Fresnedo G, Gómez-Alamillo C, Merino R, Benito MJ, Cacho E, Rodrigo E, Palomar R, López-Hoyos M, Arias M.

Transplantation. 2006 Aug 27;82(4):550-7.

2. Regulatory T cells in renal transplantation and modulation by immunosuppression.

López-Hoyos M, Segundo DS, Fernández-Fresnedo G, Marín MJ, González-Martín V, Arias M.

Transplantation. 2009 Aug 15;88(3 Suppl):S31-9. Review.

3. T(H)17 versus Treg cells in renal transplant candidates: effect of a previous transplant.

San Segundo D, López-Hoyos M, Fernández-Fresnedo G, Benito MJ, Ruiz JC, Benito A, Rodrigo E, Arias M.

Transplant Proc. 2008 Nov;40(9):2885-8.

4. Association between serum soluble CD30 and serum creatinine before and after renal transplantation.

López-Hoyos M, San Segundo D, Benito MJ, Fernández-Fresnedo G, Ruiz JC, Rodrigo E, Gómez-Alamillo C, Benito A, Arias M.

Transplant Proc. 2008 Nov;40(9):2903-5.

5. Calcineurin inhibitors affect circulating regulatory T cells in stable renal transplant recipients.

San Segundo D, Ruiz JC, Fernández-Fresnedo G, Izquierdo M, Gómez-Alamillo C, Cacho E, Benito MJ, Rodrigo E, Palomar R, López-Hoyos M, Arias M.

Transplant Proc. 2006 Oct;38(8):2391-3.

6. Células T reguladoras y tolerancia en trasplante: efecto de la inmunosupresión farmacológica. D San Segundo, MJ Benito, G. Fernández-Fresnedo, MJ Marín, M Arias, M López-Hoyos.

Inmunología. 2007. Vol 26, Num 3: 157-167.

7. Effect of immunosuppressant blood levels on serum concentration of interleukin-17 and -23 in stable liver transplant recipients.

Fábrega E, López-Hoyos M, San Segundo D, Casafont F, Benito MJ, Pons-Romero F.

Transplant Proc. 2009 Apr;41(3):1025-7.

8.Changes in the serum levels of interleukin-17/interleukin-23 during acute rejection in liver transplantation.

Fábrega E, López-Hoyos M, San Segundo D, Casafont F, Pons-Romero F.

Liver Transpl. 2009 Jun;15(6):629-33.

9.Antiphospholipid antibodies after renal transplantation and cardiovascular disease.

Fernández-Fresnedo G, López-Hoyos M, San Segundo D, Crespo J, Ruiz JC, De Francisco AL, Arias M.

Clin Transplant. 2008 Sep-Oct;22(5):567-71. Epub 2008 May 19.

10.Changes in the expression of the immunoglobulin-like transcript 3 (ILT3) and ILT4 receptors in renal allograft recipients: effect of donor and recipient aging.

Benito MJ, Lopez-Hoyos M, Fernandez-Fresnedo G, Ruiz JC, Benito A, San Segundo D, Gomez-Alamillo C, Arias M.

Transplant Proc. 2008 Nov;40(9):2894-6.