

UCH-FC  
MAG-B  
M 244  
C. 1



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LINFOCITOS T REGULADORES  
ALOGÉNICOS PARA PRODUCIR TOLERANCIA *IN VIVO***

Tesis de Magíster

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Grado de

Magíster en Ciencias Biológicas

Por

**Paula Andrea Maldonado Villavicencio**

**Directora de Tesis: Dra. María Rosa Bono**

**Enero, 2014**

**Santiago – Chile**

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE



**INFORME DE APROBACION  
TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata.

**PAULA ANDREA MALDONADO VILLAVICENCIO**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el exámen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 16 de enero de 2014.

**Director de Tesis:**

Dra. María Rosa Bono

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'María Rosa Bono', written over a horizontal line.

**Comisión de Evaluación de la Tesis**

Dr. Mario Roseblatt

A circular stamp with the text 'FACULTAD DE CIENCIAS' at the top, 'BIBLIOTECA CENTRAL' in the center, and 'U. DE CHILE' at the bottom. The stamp is surrounded by several handwritten signatures in blue ink.

Dra. Verónica Palma

Santiago de Chile, enero de 2014.

A todos los resilientes.

## AGRADECIMIENTOS

A todos los integrantes del inmunolab, especialmente a los Drs. María Rosa Bono y Mario Roseblatt, por todos los conocimientos, críticas y apoyo entregados durante estos años que pasé por su laboratorio. Con Uds. Aprendí cómo trabajar en ciencia, sobre disciplina y rigurosidad, sobre la importancia de plantearse grandes preguntas y buscar sus respuestas.

A mi gran amigazo canuto Leo, por los buenos momentos compartidos. Por todo tu apoyo y comprensión en los momentos difíciles, por la amenaza permanente de parrillada y por la alegría que nos proporcionas a todos, porque admitamos que en más de alguna ocasión eres el alma de la fiesta. Además eres enfermo de paleta y buen amigo, por todas estas razones, gracias.

A mis compañeras del team trasplante Paulina y Yessia con las cuales compartí largas jornadas de trabajo. A todos los integrantes del laboratorio: Daniela, Felipe, Dominique, Gabriela, Valeria, Sarah, Natalia, Camila, María José, Constanza, uff la lista es larga... Alejandra, Paz, Pamela, Oscar y Jocelyn (gracias por tu disponibilidad para todas las horas extraordinarias de *sorter*, sin ti no hubiese sido posible!). A todos gracias por compartir el día a día en el lab, por los buenos momentos, los postres y por la camaradería para sobrellevar los pesares de Azkaban.

A mi madre y mis hermanos Camila, Gonzalo, Ignacio y Felipe, por todo el apoyo, comprensión y soporte que me dieron en todo momento. Camí, gracias por estar ahí para escuchar, por tu empatía y apoyo. Haces que verdaderamente no estemos solos cuando compartimos contigo. Gracias por crecer conmigo.

Finalmente, gracias a mi compañero de la vida Oscar. Por las largas horas de espera en el lab, por las horas de conversación y discusión crítica. Por estar conmigo siempre. Por querer hundirse en su ocaso y por intentarlo juntos.

A todos gracias.

## INDICE DE CONTENIDOS

Indice de contenidos.....	v
Indice de figuras.....	vii
Lista de abreviaturas.....	viii
Resumen.....	xi
Abstract.....	xiii
1. Introducción.....	1
1.1 Tolerancia inmune.....	1
1.2 Inducción de tolerancia inmune mediante quimerismo mixto.....	3
1.3 Uso de Tregs como terapia celular para inducir tolerancia inmune.....	5
1.4 Inmunosupresión y Tregs.....	6
2. Hipótesis y Objetivos.....	10
2.1 Hipótesis.....	10
2.2 Objetivo General.....	10
2.3 Objetivos Específicos.....	10
3. Materiales y Métodos.....	11
3.1 Ratones.....	11
3.2 Anticuerpos y reactivos.....	11
3.3 Marcaje inmunofluorescente de células.....	12
3.4 Marcaje inmunofluorescente de células de sangre.....	12
3.5 Marcaje intracelular de Foxp3.....	13
3.6 Purificación de LT vírgenes.....	14
3.7 Purificación de células presentadoras de antígeno.....	15
3.8 Inducción <i>in vitro</i> de Tregs donante-específicos.....	16
3.9 Inducción <i>in vitro</i> de Tregs utilizando RA.....	17

3.10 Transferencia adoptiva de Tregs inducidos con RA y ensayo de supresión.....	18
3.11 Trasplante de Médula ósea e inducción de quimerismo mixto.....	20
3.12 Evaluación de quimerismo.....	21
3.13 Trasplante de piel.....	22
3.14 ELISPOT.....	22
3.15 Análisis estadístico.....	24
4. Resultados.....	25
4.1 Producción <i>in vitro</i> de LT reguladores donante-específicos.....	25
4.2 Estabilidad funcional de los linfocitos Tregs.....	28
4.3 Inmunogenicidad de distintas combinaciones de moléculas de histocompatibilidad de ratones receptores y donantes para el establecimiento de un protocolo de trasplante de MO.....	32
4.4 Uso de inmunosupresores, bajas dosis de irradiación y distintas dosis de MO alogénica para el establecimiento de un protocolo de trasplante de MO no mieloablativo.....	35
4.5 Tregs donante-específicos generados <i>in vitro</i> inducen quimerismo mixto utilizando un protocolo de trasplante de médula ósea no mieloablativo.....	38
4.6 Tregs donante-específicos inducen quimerismo mixto en diversos linajes hematopoyéticos.....	41
4.7 Tregs donante-específicos prolongan la supervivencia de injertos de piel alogénica.....	45
4.8 Ratones quiméricos presentan Tregs de origen alogénico.....	48
4.9 Ratones receptores de MO alogénica y Tregs donante-específicos presentan una producción reducida de IFN- $\gamma$ frente a un estímulo alogénico.....	50
5. Discusión.....	53
6. Conclusiones.....	65
7. Bibliografía.....	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Tregs donante-específicos inducidos <i>in vitro</i> en condición TILRA.....	26
<b>Figura 2.</b> Fenotipo de Tregs inducidos <i>in vitro</i> en condición TILRA.....	27
<b>Figura 3.</b> Expresión de receptores de <i>homing</i> de Tregs inducidos <i>in vitro</i> en condición TILRA.....	28
<b>Figura 4.</b> Tregs transferidos adoptivamente y recuperados después de 4 días son estables.....	30
<b>Figura 5.</b> Tregs transferidos adoptivamente y recuperados después de 4 días son funcionales.....	31
<b>Figura 6.</b> Uso de distintas combinaciones de cepas de ratones receptores y donantes para el establecimiento de un protocolo de trasplante de MO.....	34
<b>Figura 7.</b> Establecimiento de un protocolo de trasplante de MO no mieloablativo, utilizando baja dosis de irradiación, inmunosupresores y distintas dosis de MO.....	37
<b>Figura 8.</b> Tregs donante-específicos combinados con un protocolo no mieloablativo de trasplante de MO, producen quimerismo mixto.....	40
<b>Figura 9.</b> Reconstitución hematopoyética de ratones trasplantados con médula ósea y linfocitos Tregs donante-específicos.....	43
<b>Figura 10.</b> Reconstitución hematopoyética en el tiempo de ratones trasplantados con médula ósea y linfocitos Tregs donante-específicos.....	44
<b>Figura 11.</b> Receptores de MO alogénica tratados con Tregs presentan un aumento en la sobrevivencia de los aloinjertos de piel.....	47
<b>Figura 12.</b> Receptores de MO alogénica tratados con Tregs donante-específicos presentan Tregs de haplotipo del donante en PBMCs y bazo.....	49
<b>Figura 13.</b> Ratones trasplantados de MO tratados con Tregs donante-específicos no producen citoquinas de tipo Th1, Th2 ni Th17.....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Ab</b>	Anticuerpo ( <i>Antibody</i> )
<b>Aba</b>	Abatacept (CTLA-4Ig)
<b>AEC</b>	<i>3-amino-9-ethyl carbazole</i>
<b>APC</b>	<i>Allophycocianin</i>
<b>APCs</b>	Células presentadoras de antígeno ( <i>Antigen presenting cells</i> )
<b>BCR</b>	Receptor del linfocito B ( <i>B cell receptor</i> )
<b>CCR</b>	<i>C-C chemokine receptor type</i>
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>
<b>CTLA-4Ig</b>	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 immunoglobulin</i>
<b>DCs</b>	Células dendríticas ( <i>Dendritic Cells</i> )
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ELISPOT</b>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Spot</i>
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
<b>FCS</b>	Suero fetal bovino ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
<b>FITC</b>	<i>Fluorescein iso thyo-cyanate</i>
<b>FR4</b>	Receptor de folato 4
<b>GARP</b>	<i>Glycoprotein A Reiterations Predominant</i>
<b>GFP</b>	<i>Green fluorescent protein</i>
<b>GITR</b>	<i>Glucocorticoid-induced TNFR-related protein</i>
<b>HRP</b>	<i>Horseradish Peroxidase</i>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gamma



<b>IL-2</b>	Interleuquina-2
<b>IL-4</b>	Interleuquina-4
<b>IL-17</b>	Interleuquina-17
<b>IMDM</b>	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
<b>iTregs</b>	Linfocitos T reguladores inducibles
<b>Lag-3</b>	<i>Lymphocyte-activation gene 3</i>
<b>LT</b>	Linfocito T
<b>MHC</b>	Complejo principal de histocompatibilidad ( <i>Major histocompatibility complex</i> )
<b>MO</b>	Médula ósea
<b>MST</b>	<i>Median survival time</i>
<b>NK</b>	<i>Natural killer</i>
<b>nTregs</b>	Linfocitos T reguladores naturales
<b>PBMCs</b>	Células mononucleares sanguíneas periféricas ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PE</b>	<i>Phycoerythrin</i>
<b>PE-Cy7</b>	<i>Phycoerythrin cyanine 7</i>
<b>RA</b>	Ácido retinoico ( <i>Retinoic acid</i> )
<b>Rapa</b>	Rapamicina
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>SFC</b>	<i>Spot forming cells</i>
<b>SEM</b>	Error Estándar del promedio ( <i>Standard Error of Mean</i> )
<b>TBI</b>	<i>Total body irradiation</i>
<b>TCR</b>	receptor del linfocito T ( <i>T cell receptor</i> )

<b>TGF-β</b>	<i>Transforming Growth Factor – β</i>
<b>Th1</b>	T helper 1
<b>Th2</b>	T helper 2
<b>Th17</b>	T helper 17
<b>TILRA</b>	TGF-β, IL-2 y RA
<b>Tregs</b>	Linfocitos T reguladores

## RESUMEN

El principal desafío en la investigación de trasplantes es controlar la respuesta inmune generada contra los antígenos del donante, la cual causa el rechazo de los injertos. Promover mecanismos de tolerancia inmunológica a injertos alogénicos podría evitar el rechazo y el uso crónico de drogas inmunosupresoras, las cuales son altamente tóxicas e inducen un estado de inmunosupresión generalizada, en lugar de un efecto específico sobre los linfocitos T aloreactivos. El principal objetivo de este trabajo es generar tolerancia inmunológica específica contra los antígenos del donante, permitiendo que el receptor mantenga la capacidad de responder a potenciales patógenos y tumores.

Los linfocitos T reguladores (Tregs) tienen un rol crítico en la inducción y mantención de la tolerancia inmune. En este trabajo, proponemos que la transferencia de Tregs específicos contra antígenos de un donante, a un receptor de trasplante permitiría inclinar el balance hacia la sobrevivencia del trasplante y generar tolerancia al injerto.

Para evaluar si los Tregs donante-específicos permiten inducir tolerancia y la consecuente aceptación de un trasplante, utilizamos Tregs donante-específicos para inducir quimerismo mixto y así producir tolerancia natural al donante. El quimerismo mixto se produjo a través de un trasplante de médula ósea combinado con Tregs donante-específicos y un pre-acondicionamiento con 300 cGy TBI, 3 dosis de Rapamicina y una dosis de Abatacept. La generación de quimerismo mixto estable fue absolutamente dependiente de la presencia de Tregs donante-específicos al momento de reconstituir el compartimento hematopoyético. Por otra parte, la sobrevivencia de los injertos

de piel alogénica fue dependiente del tratamiento con Tregs donante-específicos en los ratones trasplantados. Además, los ratones que aceptaron un trasplante no presentaron una respuesta inmune celular contra las células del donante *in vitro*.

En consecuencia, los Tregs donante-específicos permitieron inducir quimerismo mixto o tolerancia a largo plazo a la médula ósea alogénica trasplantada, reducir el rechazo de un injerto de piel alogénica, todo esto sin el uso adicional de drogas inmunosupresoras. Estos resultados constituyen una nueva aproximación para reducir el uso crónico de drogas inmunosupresoras en pacientes trasplantados.

## ABSTRACT

A major challenge in transplantation research is to control immune responses against donor antigens responsible for graft rejection. Promoting mechanisms of immune tolerance to allograft could avoid graft rejection and the chronic use of immunosuppressive drugs, which are highly toxic and induce a general state of immunosuppression instead of a specific effect over alloreactive T cells. The main goal of this work is to generate specific immune tolerance to donor antigens, allowing the host to keep its capacity of responding to potential pathogens and malignancies.

Regulatory T cells (Tregs) play a critical role in the induction and maintenance of immune tolerance. In this work we propose that adoptively transferred Tregs, which are specific against antigens of a donor, to a transplant recipient, would shift the balance towards graft survival and to induce tolerance to the allograft.

To evaluate whether donor-specific Tregs induce tolerance and graft acceptance, we used donor-specific Tregs to induce mixed chimerism and thus to produce natural tolerance to the donor. Mixed chimerism was produced through a bone marrow transplant combined with donor-specific Tregs and a preconditioning with 300 cGy TBI, 3 doses of Rapamycin, and a dose of Abatacept. The generation of stable mixed chimerism was absolutely dependent on the presence of donor-specific Tregs at the moment of the reconstitution of the hematopoietic compartment. Moreover, survival of allogeneic skin injerts was dependent on the treatment with donor-specific Tregs in transplanted mice. In addition, mice that accepted a graf did not present a cellular

immune response against donor cells *in vitro*.

In consequence, donor-specific Tregs induced mixed chimerism or long-term tolerance to transplanted allogeneic bone marrow, that reduces the rejection of skin allografts, without using additional immunosuppressive drugs. These results constitute a new approach to reduce the chronic use of immunosuppressive drugs in transplanted patients.

## 1. INTRODUCCION

### 1.1 Tolerancia inmune

El sistema inmune protege al huésped de un amplio rango de patógenos, desarrollando una respuesta mediada por linfocitos T (LT), linfocitos B (LB) y células del sistema inmune innato. Después de la destrucción de los patógenos, la regulación inmune impide una reacción excesiva o deslocalizada que podría dañar los tejidos propios, permitiendo la mantención o el restablecimiento de un ambiente homeostático. El estado en el cual el sistema inmune no responde a algún antígeno es conocido como “tolerancia inmune”. Este estado involucra la tolerancia a los antígenos propios, la cual es establecida y mantenida para impedir el daño del huésped.

En el caso de trasplantes de órganos y células, el sistema inmune del huésped reconoce las moléculas de histocompatibilidad (MHC) o aloantígenos presentes en la superficie de las células del injerto, sea este sólido o celular, causando el rechazo del injerto. El reconocimiento alogénico ocurre mediante un mecanismo directo o indirecto. La vía directa es mediada por el reconocimiento de los MHC presentes en las células presentadoras de antígeno (APCs) del donante por linfocitos T alogénicos, mientras que la vía indirecta involucra la presentación de antígenos del donante por las APCs del receptor a linfocitos T (Brett Charlton et al., 1994).

En 1953 el grupo de Medawar proporcionó la primera evidencia de adquisición de tolerancia inmunológica a aloinjertos, mediante la inoculación de una suspensión de células vivas desde un ratón adulto a un ratón recién nacido, un fenómeno que llamaron

“adquisición activa de tolerancia” (Billingham et al., 1953). Este resultado planteó el desafío de lograr inducir tolerancia a trasplantes como una meta clínica para producir la aceptación de aloinjertos en adultos.

La tolerancia inmune a los antígenos propios es producida naturalmente e involucra mecanismos centrales y periféricos. La tolerancia central ocurre en el timo para los LT y en la médula ósea para los LB, y se produce mediante mecanismos como delección clonal, edición del receptor para el antígeno e inducción de anergia. La delección clonal ocurre durante la maduración de los linfocitos T en el timo, donde las células T inmaduras que se unen con alta afinidad a antígenos propios expresados por las células estromales del timo son programadas para morir por apoptosis (Hogquist et al., 2005). En contraste, el receptor del linfocito T (TCR) o del linfocito B (BCR) autoreactivo puede ser editado o reemplazado por uno que no reconoce antígenos propios, eliminando así la autoreactividad del receptor sin eliminar la célula misma (Hogquist et al., 2005; Nemazee, 2006). La inducción de anergia causa la falta de respuesta de las células T y B frente a su antígeno específico, aún bajo condiciones óptimas de estimulación (Hogquist et al., 2005).

Por otra parte, los mecanismos periféricos de tolerancia involucran delección de LT efectores activados, inducción de anergia, extenuación clonal y regulación activa de los LT efectores (Wood et al., 2003). La regulación activa de la respuesta inmune es mediada por células inmunes regulatorias que inhiben la función de otras células, entre las cuales las más ampliamente estudiadas son los LT reguladores (Tregs) (Bilate & Lafaille, 2012; Josefowicz et al., 2012; Sakaguchi et al., 2010; Sakaguchi et al., 2008). Existen otros tipos de células inmunes regulatorias, las cuales se diferencian en su origen



y mecanismos inmunosupresores. Entre ellos se encuentran: macrófagos reguladores, células dendríticas tolerogénicas, células mieloides supresoras, LB reguladores, LT reguladores CD4+, LT reguladores CD8+, células NKT (*Natural Killer T cells*), LT reguladores CD4-CD8-, entre otros (Wood et al., 2012). Los dos principales tipos de LT CD4+ reguladores son los Tregs naturales (nTregs), los cuales se generan en el timo y regulan la respuesta inmune en la periferia y los Tregs inducibles (iTregs), los cuales se generan en la periferia a partir de LT vírgenes, luego de estar expuestos a antígenos presentados por células presentadoras de antígeno tolerogénicas (Wood et al., 2003).

### **1.2 Inducción de tolerancia inmune mediante quimerismo mixto**

La primera aproximación para inducir tolerancia, mediante quimerismo mixto hematopoyético fue descrita por Owen en 1945, quien observó que mellizos de bovino que habían compartido circulación sanguínea en la placenta, presentaban un estado de quimerismo hematopoyético, es decir, coexistían células del linaje hematopoyético de ambos individuos en cada uno de ellos. Estos bovinos que eran genéticamente distintos, es decir, que tenían distintos MHC, pero que presentaban células del linaje hematopoyético de su hermano, eran tolerantes a trasplantes de piel entre ellos (Anderson, et al., 1951; Billingham, et al., 1952; Owen, 1945, 1959).

En estudios posteriores, se estableció tolerancia a injertos de piel mediante la ablación de los receptores con rayos X y la inoculación de médula ósea como fuente de células troncales (Main & Prehn, 1955). El quimerismo mixto provee una fuente permanente de antígenos del donante, permitiendo la delección de linfocitos aloreactivos y, subsecuentemente la inducción de tolerancia inmune (Pasquet et al., 2013; Pilat et al.,

2010; Pilat et al., 2011; Wekerle et al., 1998, 1999). El principio básico de la inducción de quimerismo mixto es extender la tolerancia que se establece a los antígenos propios, al nuevo repertorio de antígenos propios, los cuales incluyen los antígenos introducidos a través del órgano del donante.

La inducción de tolerancia inmune a injertos alogénicos que se logra mediante la inducción de quimerismo mixto, se caracteriza por ser específica y permitir que el receptor mantenga la capacidad de responder a potenciales patógenos y tumores (Pilat & Wekerle, 2010). Sin embargo, pese a que el establecimiento de quimerismo mixto permite la eliminación de los clones aloreactivos, en un organismo adulto pre-existen LT aloreactivos en circulación. En consecuencia, los protocolos para inducir quimerismo requieren condicionar los receptores, ya sea mediante ablación usando irradiación total del cuerpo, drogas citotóxicas o eliminación de los LT con anticuerpos específicos (Cobbold et al., 1986; Ildstad & Sachs, 1984; Wells et al., 1999). De este modo, para inducir tolerancia inmune mediante trasplante de médula ósea es necesario un condicionamiento del receptor que es tóxico, lo cual conlleva el riesgo de falla de la anidación del injerto y por último produce la enfermedad del injerto contra el huésped (GVHD) que puede ser fatal (Deeg & Storb, 1984; Pilat & Wekerle, 2010; Li & Sykes, 2012). Todas estas razones han impedido el uso del trasplante de médula ósea como protocolo clínico para inducir tolerancia inmune.

Estudios recientes se han enfocado en combinar el trasplante de médula ósea con el uso de bloqueadores de la coestimulación, lo cual ha permitido la inducción de quimerismo mixto con una toxicidad considerablemente menor (Ford & Larsen, 2009; Pree et al., 2007; T Wekerle et al., 1999; Wekerle et al., 2002). Los principales blancos de estos

bloqueadores son las vías de coestimulación de CD28-CD80/86 y CD40-CD154 (Sayegh & Turka, 1998), donde la combinación con irradiación es efectiva para prevenir el rechazo de la médula ósea (Pilat et al., 2011).

### **1.3 Uso de Tregs como terapia celular para inducir tolerancia inmune**

La función de los Tregs es mantener la tolerancia inmune y prevenir enfermedades inflamatorias. Se ha demostrado en modelos de ratón y enfermedades humanas que la falta de Tregs causa autoinmunidad y la activación desregulada de los LT (Sakaguchi et al., 2008). La función u homeostasis alterada de los Tregs ha sido implicada en la diabetes tipo 1, artritis reumatoide, esclerosis múltiple y lupus eritematoso sistémico (Shevach et al., 2006). Dada la función crítica de los Tregs en la mantención de la tolerancia inmune, se ha propuesto su uso como terapia para inducir tolerancia inmune específica y reducir el uso de drogas inmunosupresoras en protocolos de trasplantes. Muchos grupos han usado Tregs aislados directamente de bazo o Tregs expandidos *in vitro* en combinación con drogas inmunosupresoras o ablación inmune como estrategia para generar tolerancia inmune y aceptación de injertos alogénicos (Golshayan et al., 2007; Joffre et al., 2008; Joffre et al., 2004; Raimondi et al., 2010). Se ha demostrado que la inyección de nTregs aislados o nTregs aislados y cultivados *ex vivo*, reduce significativamente la GVHD (Hoffmann et al., 2002; Taylor et al., 2002), y que combinados con un trasplante de médula ósea, inhiben la activación de los LT CD4+ y CD8+ aloreactivos, prolongando la sobrevida del aloinjerto (Joffre et al., 2008; Joffre et al., 2004).

Los Tregs pueden ser generados *in vitro* mediante activación policlonal o antígeno

específica a partir de LT vírgenes bajo ciertas combinaciones de citoquinas (Pilat et al., 2010; Moore et al., 2009). Por otra parte, es posible producir Tregs mediante activación alogénica de LT vírgenes (Moore et al., 2010; Sela et al., 2011), transducción de LT con el gen que codifica el factor de transcripción Foxp3 (Pilat et al., 2011) y, purificación directa de Tregs desde un huésped seguido de su expansión *ex vivo* en presencia de células dendríticas (DCs) alogénicas e IL-2 (Golshayan et al., 2007; Joffre et al., 2004; Joffre et al., 2008; Nishimura et al., 2004). Los Tregs han sido usados extensivamente en la generación de quimerismo mixto utilizando distintas combinaciones de condicionamiento mieloablativo e inmunosupresor, donde el repertorio de LT del receptor es mantenido intacto. En estas condiciones el receptor no responde ante los antígenos del donante, pero sus LT proliferan frente al estímulo con antígenos de una tercera cepa *in vitro*, y a su vez el receptor rechaza un injerto de una tercera cepa *in vivo* (Joffre et al., 2008; Pilat et al., 2011; Raimondi et al., 2010). En la periferia los Tregs son aproximadamente 5-10% de los LT CD4+ totales en ratones y humanos (Sakaguchi, 2004). El cultivo *in vitro* de LT vírgenes con células presentadoras de antígeno alogénicas, en presencia de TGF- $\beta$  y RA promueve la generación de Tregs a partir de un repertorio de LT aloreactivos, en consecuencia, es posible expandir Tregs alogénicos (Sela et al., 2011).

#### **1.4 Inmunosupresión y Tregs**

El tratamiento terapéutico para inducir la aceptación de los aloinjertos en pacientes trasplantados, consiste principalmente en el uso de drogas inmunosupresoras. El desarrollo de nuevas drogas y protocolos que combinan el uso de distintas drogas

inmunosupresoras está en continuo progreso, sin embargo, la toxicidad de las drogas, el rechazo crónico, el riesgo de infecciones oportunistas, cáncer y otros efectos colaterales asociados a la toxicidad de las drogas como efectos nefrotóxicos (eg. Ciclosporina) y diabetogénicos (eg. tacrolimus) (Robles & Monroy, 2011), siguen siendo problemas sin resolver.

Estos tratamientos involucran diferentes combinaciones de drogas inmunosupresoras dependiendo del tipo de trasplante. Algunos protocolos de condicionamiento usados en trasplantes de células hematopoyéticas en humanos consisten en la deleción de leucocitos usando, por ejemplo, una preparación de anticuerpos monoclonales o policlonales, tales como alemtuzumab (anti-CD52), el anticuerpo monoclonal anti-CD2 (MEDI-507) o anticuerpos policlonales globulina anti-timocito, los cuales inducen linfopenia (Brunstein et al., 2011; Ogawa et al., 2006). Entre las drogas inmunosupresoras más usadas se encuentran los inhibidores de la calcineurina, Tacrolimus y Ciclosporina A, los cuales inhiben la producción de IL-2 y otras citoquinas, inhibiendo la diferenciación de LT efectores (Blaha et al., 2003), sin embargo también reducen la actividad supresora de los Tregs, reduciendo la capacidad de Foxp3 para reprimir *Il2* y activar *Ctla4* y *Cd25* (Wu et al., 2006). Otras drogas como Micofenilato mofetil, Azatioprina y Mizoribine, presentan un efecto anti-proliferativo mediado por la inhibición de la síntesis de purinas (Blaha et al., 2003). Ambos tipos de drogas inhiben la activación de células T efectoras, pero su efecto no está restringido a este tipo celular.

En contraste, se ha demostrado que la Rapamicina, una droga inmunosupresora cuyo blanco es la vía mTOR, permite la generación de Tregs *ex vivo* y promueve su función *in*

*vivo* (Hester et al., 2012; Wu et al., 2012). También se ha demostrado una relación sinérgica entre la inhibición de mTOR y el bloqueo de las vías de co-estimulación de CD40-L y CD28, permitiendo así la aceptación de aloinjertos (Raimondi et al., 2010). Por lo tanto, el uso de combinaciones de agentes inmunosupresores en trasplantes resalta los desafíos asociados con el diseño de protocolos que sean compatibles con la mantención de la tolerancia inmune mediada por mecanismos periféricos, como la actividad de los Tregs.

Los problemas de la toxicidad de las drogas inmunosupresoras y su uso prolongado pueden ser claramente eliminados mediante la inducción de tolerancia inmune al aloinjerto (Billingham et al., 1953; Brett Charlton et al., 1994; Sykes, 2007). El uso de Tregs tiene potencial para inhibir la actividad de células efectoras y promover la aceptación del injerto. Los Tregs han tenido un efecto potente en modelos de trasplante murino, la evidencia actual indica que los Tregs son capaces de inducir una sobrevida prolongada de los injertos de piel alogénica en ratones inmunocompetentes (Lee et al., 2004). El uso terapéutico de Tregs es una aproximación interesante en el trasplante de médula ósea alogénica, si se desarrolla en un régimen de baja inmunosupresión que permita el establecimiento de quimerismo mixto.

En investigaciones realizadas previamente en nuestro laboratorio se han inducido *in vitro* Tregs antígeno específicos mediante la activación de LT vírgenes en presencia de APCs, combinado con TGF- $\beta$ , baja concentración de antígeno y ácido retinoico (RA) (Moore et al., 2009). Además, se ha generado un protocolo para inducir Tregs específicos a aloantígenos, mediante la estimulación de LT vírgenes con APCs

alogénicas y una combinación de TGF- $\beta$ , IL-2 y RA (Moore et al., 2010). Estos Tregs donante-específicos presentan actividad inmunosupresora *in vitro*, en consecuencia, podrían ser utilizados como una terapia celular específica que, combinada con un régimen de baja inmunosupresión, permitan inducir tolerancia inmune al injerto alogénico de médula ósea y, subsecuentemente permitir la tolerancia a trasplantes de órganos sólidos (Joffre et al., 2008; Raimondi et al., 2010).

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1 Hipótesis**

La inducción de quimerismo mixto a través de Tregs donante–específicos y bajas dosis de inmunosupresores favorece la aceptación de un trasplante de piel alogénico.

### **2.2 Objetivo General**

Inducir tolerancia a un trasplante alogénico utilizando linfocitos T reguladores donante-específicos generados *in vitro*.

### **2.3 Objetivos Específicos**

- 2.3.1 Desarrollar un protocolo experimental no mieloablativo para la generación de quimerismo mixto, utilizando LT reguladores donante-específicos.
- 2.3.2 Evaluar la tolerancia a trasplantes de piel alogénico en ratones quiméricos.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Ratones

Se utilizaron ratones C57BL/6 (haplotipo H-2<sup>b</sup>, CD45.2+), Balb/c (haplotipo H-2<sup>d</sup>), C57BL/6 OTII (CD45.2+), C57BL/6 [OTII x Foxp3-GFP]F1 (CD45.2+/CD45.1+) y C57BL/6 B6SJL-PTPRC (CD45.1+) de 8 a 16 semanas de edad. Estos ratones se adquirieron en The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) y fueron mantenidos en el bioterio de Fundación Ciencia & Vida. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo las condiciones establecidas por el comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

#### 3.2 Anticuerpos y reactivos

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales de BD Pharmingen (Franklin Lakes, NJ, USA): anti-H2K<sup>b</sup> FITC (AF6.88.6), anti-H2K<sup>d</sup> PE (SF1-1.1), anti-H2K<sup>k</sup> PE (36-7-5), y anti-CD19 APC-H7 (1D3); de eBioscience (San Diego, CA, USA): anti-CD4 FITC (RM4-5), anti-CD103 FITC (M290), anti-CD25 PE (PC61.5), anti-CD39 PE (24DMS1), anti-FR4 PE (eBio12A5), anti-CTLA-4 PE (UC10-4F10-11), anti-CD49d PE (9C10), anti-CCR9 PE (eBioCW-1.2), anti- $\alpha$ 4 $\beta$ 7 PE (DATK32), anti-CD8a PE-Cy7 (53-6.7), anti-Gr-1 PE-Cy7 (GL7), anti-FoxP3 PE-Cy7 (FJK-16s), anti-CD4 APC (6K1.5), anti-CD3 APC (17A2), anti-CD101 APC (RM101), anti-Lag-3 APC (C9b7w), anti-CD16/32 (2.4G2), anti-CD3 *Functional grade purified* (145-2C11); y de BioLegend (San Diego, CA, USA): anti-CD4 PE (RM4-5), anti-CCR6 PE (29-2L17), anti-F4/80 APC-Cy7(BM8), anti-CD45.2 Alexa fluor 647 (104).

Se utilizó TGF- $\beta$ 1 recombinante humano de eBioscience (San Diego, CA, USA); IL-2 recombinante murino de R&D System (Minneapolis, MN, USA); ácido retinoico (RA) de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA); péptido OVA<sub>323-339</sub> de Gene Tel Laboratories, LLC (Madison, USA); ovoalbúmina de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA); *kit* de marcaje de Foxp3 de eBioscience; Rapamicina (Rapa) de LC Laboratories (Woburn, MA, USA) y el bloqueador de la coestimulación Abatacept (hCTLA-4Ig) de Bristol-Myers (Orencia®, Bristol-Myers Squibb Pharmaceuticals, Princeton, NJ, USA). Para el marcaje de LT vírgenes con un trazador celular, se utilizó el kit *Cell trace violet cell proliferation* de Invitrogen (Eugene, Oregon, USA).

### **3.3 Marcaje inmunofluorescente de células**

Para el marcaje superficial de las células con anticuerpos fluorescentes, se incubaron las células con el anticuerpo anti-CD16/32 (*Fc-block*) diluido 1/400 en PBS + 2% FCS durante 10 minutos a 4°C. Luego, se agregaron los anticuerpos monoclonales a la dilución apropiada en PBS + 2% FCS y se incubaron las células durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. A continuación, las células se lavaron con 1 mL de PBS + 2% FCS, se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y se resuspendieron en PBS + 2% FCS. Las células marcadas se analizaron en un citómetro de flujo FACSCanto II (Beckton Dickinson, San José, CA).

### **3.4 Marcaje inmunofluorescente de células de sangre**

Para marcar la superficie de las células de sangre con anticuerpos fluorescentes, se colectó sangre arterial de los ratones en tubos con 50  $\mu$ L heparina sódica, posteriormente se agregó *Fc-block* (anti-CD16/32, a una dilución 1/100) y se incubó durante 20 minutos

a temperatura ambiente. Se tomaron 50  $\mu$ L de sangre y se agregaron 50  $\mu$ L de una mezcla de anticuerpos 2X diluidos en PBS + 2% FCS, se incubó con estos anticuerpos durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Luego se lisaron los glóbulos rojos, incubando con 1 mL de BD FACS Lysing solution (BD Bioscience) durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente se centrifugaron las células a 600 x g durante 7 minutos, se resuspendieron en PBS + 2% FCS y se analizaron mediante citometría de flujo.

### 3.5 Marcaje intracelular de Foxp3

Las células se incubaron con el anticuerpo anti-CD16/32 (*Fc-block*) diluido 1/400 en PBS + 2% FCS durante 10 minutos a 4 °C, posteriormente se marcó la superficie de las células incubando con los anticuerpos CD25-PE y CD4-APC durante 20 minutos a 4 °C en oscuridad. Luego se agregó 1 mL de PBS + 2% FCS y se centrifugó a 600 x g durante 7 minutos, se eliminó el sobrenadante y se incubó con 300  $\mu$ L de *buffer* de fijación y permeabilización (*kit* marcaje de Foxp3, eBioscience) durante 30 minutos a 4 °C en oscuridad. A continuación, se agregaron 700  $\mu$ L de *buffer* de permeabilización y se centrifugó a 700 x g durante 8 minutos, se eliminó el sobrenadante y se incubaron las células con el anticuerpo monoclonal Foxp3-PECy7 diluido 1/200 en *buffer* de permeabilización durante 30 minutos a 4 °C en oscuridad. Finalmente, se agregaron 700  $\mu$ L de *buffer* de permeabilización, se centrifugó a 700 x g durante 8 minutos, se resuspendieron las células en PBS + 2% FCS y se analizaron mediante citometría de flujo.



Para el marcaje inmunofluorescente de Tregs en sangre, se marca la superficie de las células de sangre como se describe en la sección 3.4, utilizando la siguiente mezcla de los anticuerpos 2X diluidos en PBS + 2% FCS: anti-CD25 PE, anti-CD4 APC y anti-H-2K<sup>b</sup> FITC. Después de la lisis de glóbulos rojos, se lavaron las células con 1 mL de PBS + 2% FCS, se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4 °C y se resuspendieron en 300 µL de *buffer* de fijación y permeabilización, se prosigue con el marcaje intracelular de Foxp3, a partir de la incubación con *buffer* de fijación y permeabilización, como se describe más arriba en esta sección.

### **3.6 Purificación de LT vírgenes**

Los LT vírgenes se obtuvieron a partir de bazo de ratón mediante selección inmunomagnética. Para esto se perfundió el bazo con IMDM + 10% FCS, la suspensión celular obtenida fue centrifugada a 600 x g durante 7 minutos a 4 °C y se eliminaron los eritrocitos agregando 2 mL de *buffer* de lisis de glóbulos rojos (*RBC buffer*, BioLegend) durante 5 minutos a 4 °C. Las células se lavaron con IMDM + 10% FCS y se contaron. Se seleccionaron las células CD4<sup>+</sup> utilizando un *kit* de purificación inmunomagnético MACS CD4<sup>+</sup> T-cell isolation kit II (Miltenyi Biotec). Para esto, las células se resuspendieron en 40 µL de *buffer* de purificación (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100mM, EDTA 2 mM, 0.5% FCS, pH 7,4) por cada 1·10<sup>7</sup> células, 5 µL de *Biotin antibody cocktail* por cada 1·10<sup>7</sup> células y se incubó durante 12 minutos a 4 °C en agitación. Luego, se agregaron 30 µL de *buffer* de purificación por cada 1·10<sup>7</sup> células, 10 µL de *microbeads* anti-Biotina por cada 1·10<sup>7</sup> células y se incubó durante 20 minutos a 4 °C en agitación. Posteriormente, las células se lavaron con 10 mL de *buffer* de

purificación, se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4 °C, se resuspendieron en 500 µL de *buffer* de purificación y se seleccionaron negativamente usando un magneto (VarioMACS, Miltenyi Biotec). Se colectó la fracción negativa, la cual contenía las células CD4+ y se determinó el número de células obtenidas. Para obtener las células CD4+CD25-, a partir de las células CD4+ previamente aisladas, se eliminan las células CD4+CD25+. Para esto, las células CD4+ se resuspendieron en 100 µL de una dilución 1/100 de anticuerpo monoclonal anti-CD25 PE por cada  $1 \cdot 10^7$  células y se incubó durante 12 minutos a 4 °C en oscuridad con agitación. A continuación, las células se lavaron con 10 mL de *buffer* de purificación, se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4 °C y se resuspendieron en 80 µL de *buffer* de purificación por cada  $1 \cdot 10^7$  células, 20 µL de *microbeads* anti-PE (Miltenyi Biotec) por cada  $1 \cdot 10^7$  células, y se incubó durante 20 minutos a 4 °C en agitación. Finalmente, las células se lavaron con 10 mL de *buffer* de purificación, se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4 °C y se resuspendieron en 500 µL de *buffer* de purificación. Se seleccionaron negativamente las células CD4+CD25- usando un magneto. Al final de la purificación el número de LT vírgenes recuperado fue aproximadamente 10% de la cantidad inicial de células.

Para determinar la pureza de los LT vírgenes aislados, las células se marcaron con los anticuerpos monoclonales anti-CD25 y anti-CD4, como se describe en la sección 3.3.

Las células marcadas se analizaron mediante citometría de flujo.

### **3.7 Purificación de células presentadoras de antígeno**

Las células presentadoras de antígeno (APCs) se purificaron a partir de células de bazo mediante separación inmunomagnética utilizando esferas MACS anti-CD11c (Miltenyi

Biotec). Para esto, se extirpó el bazo de un ratón, se disgregó mecánicamente y se incubó en una solución de PBS + 10% FCS; 1 mg/mL colagenasa D (Roche); 50 µg/mL DNAsa (Roche) durante 45 minutos a 37 °C con agitación. Posteriormente, la suspensión celular se pasó por un separador celular con poros de 70 µm (*cell strainer 70 µm nylon mesh*, BD), luego se eliminaron los eritrocitos agregando 2 mL de *buffer* de lisis de glóbulos rojos (*RBC buffer*, BioLegend) durante 5 minutos a 4 °C. Las células fueron lavadas con IMDM + 10% FCS y se contaron. Luego, las células se resuspendieron en 400 µL de *buffer* MACS (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100mM, EDTA 2 mM, 5% FCS, pH 7,4) por cada 1·10<sup>7</sup> células, 100 µL de *microbeads* anti-CD11c por cada 1·10<sup>8</sup> células y se incubó durante 20 minutos a 4 °C en agitación. A continuación, las células se lavaron con 10 mL de *buffer* de purificación, se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4 °C y se resuspendieron en 500 µL de *buffer* MACS. Se seleccionaron positivamente las células CD11c+ usando un magneto y el número de APCs recuperado fue aproximadamente 30% de la cantidad inicial de células.

Se evaluó el fenotipo de las APCs obtenidas, marcando la superficie de las células (como se detalla en 3.3) con los anticuerpos monoclonales anti-IA<sup>b</sup> FITC (a una dilución de 1/100), anti-CD11c PE (1/200), anti-CD45R PE-Cy7 (B220, 1/200) y anti-CD19 APC-H7 (1/400). Las células marcadas se analizaron mediante citometría de flujo.

### **3.8 Inducción *in vitro* de Tregs donante-específicos**

Los LT vírgenes (aislados como se detalla en 3.6) de ratón Balb/c (H-2K<sup>d</sup>) se cocultivaron con APCs (detalle en 3.7) de ratón C57BL/6 (H-2K<sup>b</sup>) a una razón de 1:7 (APC:LT). Se pusieron 100 µL de una suspensión de LT vírgenes a una concentración

de  $1.4 \cdot 10^6$  células/mL y 100  $\mu$ L de una suspensión de APCs a una concentración de  $0.2 \cdot 10^6$  células/mL, es decir, se co-cultivaron  $0.14 \cdot 10^6$  LT vírgenes y  $0.02 \cdot 10^6$  APCs en cada pozo. Las células se co-cultivaron en placas de 96 pocillos de fondo redondo en medio IMDM + 10% FCS; 0.055 mM 2-mercaptoetanol; 0.5  $\mu$ g/mL fungizona; 2ng/mL TGF-  $\beta$ ; 10 nM ácido retinoico y 10 ng/mL IL-2, durante 6 días a 37 °C en una atmósfera húmeda y 5% CO<sub>2</sub>. Transcurridos los 6 días de co-cultivo, se recuperaron entre  $0.12 \cdot 10^6$  a  $0.25 \cdot 10^6$  células por pozo y se obtuvieron  $0.12 \cdot 10^6$  Tregs donante-específicos por cada  $0.14 \cdot 10^6$  LT vírgenes puestos en co-cultivo. Se determinó por citometría de flujo (como se describe en la sección 3.5) que 40 - 60 % de las células CD4+ fueron Tregs CD4+CD25+Foxp3+. Posteriormente, se seleccionaron los Tregs mediante *cell sorting* (FACS Aria II, BD Biosciences, San Jose, CA) en base a la expresión de CD4+CD25<sup>high</sup>. Adicionalmente, se determinó la pureza de los Tregs seleccionados por *cell sorting* antes de su transferencia *in vivo*, se marcaron las células con los anticuerpos monoclonales anti-CD25, anti-CD4 y anti-Foxp3 como se indica en la sección 3.5. Las células marcadas se analizaron mediante citometría de flujo y la pureza de la población seleccionada fue  $\geq 95\%$ .

### **3.9 Inducción *in vitro* de Tregs utilizando RA**

Los LT vírgenes (purificados como se indica en 3.6) de ratones transgénicos OT-II (H-2K<sup>b</sup>, CD45.2+) u [OT-II x Foxp3-GFP]F1 (H-2K<sup>b</sup>, CD45.1+CD45.2+) se co-cultivaron con APCs (detalle en 3.7) de ratón C57BL/6 (H-2K<sup>b</sup>, CD45.2+) en una razón de 1:5 (APC:LT). Se pusieron 100  $\mu$ L de una suspensión de LT vírgenes a una concentración de  $1 \cdot 10^6$  células/mL y 100  $\mu$ L de una suspensión de APCs a una concentración de 0.2

$\cdot 10^6$  células/mL, es decir, se co-cultivaron  $0.1 \cdot 10^6$  LT vírgenes y  $0.02 \cdot 10^6$  APCs en cada pozo. Las células fueron co-cultivadas en un medio que contenía: IMDM + 10% FCS; 0.055 mM 2-mercaptoetanol; 0.5  $\mu$ g/mL fungizona; 2 ng/mL TGF- $\beta$ ; 10 nM ácido retinoico; 10 ng/mL IL-2; 0.1 mg/mL anti-CD3 mAb purificado y 2 ng/mL de péptido OVA<sub>323-339</sub>. El co-cultivo fue realizado en placas de 96 pocillos de fondo redondo durante 4 días a 37 °C en una atmósfera húmeda y 5% CO<sub>2</sub>. Transcurridos los 4 días de co-cultivo, se colectó el contenido de los pocillos y se marcaron las células con anticuerpos fluorescentes anti-CD4 y anti-CD25 como se describe en la sección 3.3. Posteriormente, las células marcadas se seleccionaron mediante *cell sorting* (FACS Aria II, BD Biosciences, San Jose, CA) en base a la expresión de CD4+CD25<sup>high</sup> para los Tregs generados a partir de ratones transgénicos OTII, o por la expresión de CD4+CD25<sup>high</sup>GFP+ para Tregs generados a partir de ratones transgénicos [OT-II x Foxp3-GFP]F1. La pureza de los Tregs inyectados fue verificada mediante citometría de flujo, marcando las células con anti-CD4 APC, anti-CD25 PE y anti-Foxp3 PE-Cy7 (ver sección 3.5). La pureza de la población fue  $\geq 93\%$ .

### **3.10 Transferencia adoptiva de Tregs inducidos con RA y ensayo de supresión**

Se inyectaron por vía endovenosa  $4 \cdot 10^6$  Tregs OTII (CD45.2+) inducidos en condición TILRA en un ratón B6SJL-PTPRC (CD45.1+), del mismo modo  $3 \cdot 10^6$  Tregs [OT-II x Foxp3-GFP]F1 (CD45.2+/CD45.1+) inducidos en condición TILRA fueron inyectados en un ratón B6SJL-PTPRC (CD45.1+). Un día después de la transferencia adoptiva, los ratones B6SJL-PTPRC recibieron 1 dosis de 1 mg de OVA (diluido en PBS) por vía intraperitoneal.



A continuación, 4 días después de la transferencia adoptiva, se evaluó la expresión de Foxp3 de los Tregs transferidos mediante citometría de flujo y se recuperaron desde los bazos de los ratones B6SJL-PTPRC mediante *cell sorting* para evaluar su funcionalidad mediante un ensayo de supresión.

Para recuperar los Tregs que fueron inyectados en los ratones B6SJL-PTPRC, se extrajeron los bazos de los ratones inyectados y se seleccionaron los linfocitos T CD4+, utilizando un *kit* de purificación inmunomagnético MACS CD4+ T-cell isolation kit II (Miltenyi Biotec, ver detalle en sección 3.6). Posteriormente, los LT CD4+ seleccionados se marcaron con un anticuerpo monoclonal anti-CD45.2, siguiendo el procedimiento descrito en 3.3. Los Tregs transferidos fueron purificados mediante *cell sorting* (FACS Aria II, BD Biosciences, San Jose, CA) en base a la expresión de CD45.2, en el caso de los LTregs OT-II y por la expresión de CD45.2 y GFP en el caso de los Tregs [OT-II x Foxp3-GFP]F1.

Para el ensayo de supresión, LT vírgenes y APCs de ratones C57BL/6 fueron purificados como se indica en las secciones 3.6 y 3.7. Los LT vírgenes (células T efectoras) fueron marcados con un trazador celular (*violet cell trace*). Para esto, los LT vírgenes se resuspendieron en PBS tibio (37 °C) a una concentración de  $1 \cdot 10^7$  células/mL, luego se agregó 1  $\mu$ L de *violet cell trace* 5mM por cada 1 mL de suspensión celular y se incubó durante 20 minutos a 37 °C (en baño termorregulado) en oscuridad. A continuación, se agregaron 10 mL de IMDM + 10% FCS y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y se resuspendieron las células en medio de co-cultivo (IMDM + 10% FCS; 0.055

mM 2-mercaptoetanol; 0,5 µg/mL fungizona; 2ng/mL TGF- β; 10 nM ácido retinoico y 10 ng/mL IL-2).

Los LT vírgenes marcados con *violet cell trace* fueron co-cultivados con APCs en una proporción 1:1. Se pusieron 100 µL de una suspensión de LT vírgenes a una concentración de  $0.5 \cdot 10^6$  células/mL y 50 µL de una suspensión de APCs a una concentración de  $1 \cdot 10^6$  células/mL, es decir, se co-cultivaron  $0.05 \cdot 10^6$  LT vírgenes y  $0.05 \cdot 10^6$  APCs en cada pozo. Las células se co-cultivaron en placas de 96 pozos de fondo redondo en presencia de 0.1 mg/mL anti-CD3 purificado, durante 3 días a 37 °C en una atmósfera húmeda y 5% CO<sub>2</sub>. En cada pozo se agregaron distintas cantidades ( $1 \cdot 10^6$ ,  $0.05 \cdot 10^6$ ,  $0.025 \cdot 10^6$  ó ningún) de los Tregs OT-II u [OT-II x Foxp3-GFP]F1 que fueron recuperados por *cell sorting*. Después de 3 días se analizó la dilución del trazador celular mediante citometría de flujo.

### **3.11 Trasplante de Médula ósea e inducción de quimerismo mixto**

Se extrajo médula ósea de fémures y tibias de ratones de 8 a 12 semanas de edad. Para esto los huesos se perfundieron con medio RPMI, luego se filtró la suspensión celular obtenida para eliminar restos de grasa y huesos, se centrifugó y finalmente las células se resuspendieron en PBS. Se inyectaron vía intravenosa  $20 \cdot 10^6$  a  $200 \cdot 10^6$  células de médula ósea del donante, según el experimento. Los receptores recibieron dosis de irradiación de 300, 600 ó 900 cGy (TBI), según correspondiera al experimento. Se utilizó un acelerador lineal Oncor Impression Plus (Siemens, Munich, Germany).

El régimen de inmunosupresión que se utilizó para inducir quimerismo mixto fue el siguiente: se administraron 3 dosis de 5 mg/kg/día de rapamicina, 1 dosis de CTLA4-Ig

de 24 mg/kg/día y 1 dosis de 300 cGy (TBI) de irradiación  $\gamma$ . La primera dosis de rapamicina se administró 1 día antes del trasplante de médula ósea (día -1) al igual que los 300 cGy (TBI) de radiación  $\gamma$ ; la segunda dosis de rapamicina se administró el día del trasplante de médula ósea (día 0), y la tercera dosis de rapamicina se administró en conjunto con CTLA4-Ig, 2 días después del trasplante (día 2).

Adicionalmente, los receptores de los grupos experimentales recibieron  $2.2 \cdot 10^6$  Tregs donante-específicos, en conjunto con a la médula ósea (día 0).

Luego del trasplante de médula ósea, los ratones se mantuvieron durante dos meses consumiendo alimentos y agua estériles en jaulas limpias y con filtro HEPA para evitar enfermedades mientras permanecían bajo el efecto de los inmunosupresores.

### **3.12 Evaluación de quimerismo**

Para los análisis de los trasplantes de médula ósea se tomaron muestras de sangre arterial cada tres semanas a partir de la tercera semana después del trasplante de médula ósea. Se marcaron las células de sangre con anticuerpos monoclonales anti-H2K<sup>b</sup> FITC y anti-H2K<sup>d</sup> PE (como se describe en la sección 3.4) para detectar células del donante y del receptor en sangre. Para determinar la reconstitución de los distintos linajes sanguíneos y el haplotipo de éstos se marcó sangre (detalle en 3.4) con los anticuerpos anti-H2K<sup>b</sup> FITC, anti-CD4 PE, anti-CD8a PE-Cy7, anti-CD3 APC, anti-F4/80 APC-H7, anti-CD19 APC-H7 y anti-Gr1 PE-C7. Se analizó el marcaje mediante citometría de flujo utilizando un citómetro FACSCanto II (Becton Dickinson) y el software FlowJo (Tree Star).



El quimerismo fue definido como el porcentaje neto de células del donante, determinado a partir de las células MHC clase I positivas, del total de células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMCs).

### **3.13 Trasplante de piel**

Cuatro, siete o trece semanas después del trasplante de médula ósea, los receptores (Balb/c) recibieron un injerto de piel de ratón C57BL/6. Para esto, se sacrificó un ratón de C57BL/6, se extirpó la piel de la cola y se cortó en cuadrados para ser utilizados como injertos. Los receptores recibieron una inyección subcutánea de ketoprofeno (5 mg/kg) como medida analgésica, y posteriormente se anestesiaron con Sevoflurano (SEVORANE®, Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA) al 3%, vaporizado con oxígeno al 3%. Se depiló el flanco izquierdo del lomo del receptor Balb/c, se desinfectó con alcohol iodado y se cortó la piel hasta dejar un cuadrado de aproximadamente 0.6 x 0.6 cm, luego se cubrió la zona sin piel con el injerto de piel alogénica. El injerto de piel se pegó a la piel del receptor con Colodión elástico, se desinfectó la zona del trasplante y se parchó con gasa antimicrobiana no adherente estéril (Kendall Telfa AMD de Tyco Healthcare). Se mantuvo el vendaje de 7 a 10 días después del trasplante de piel y posteriormente se evaluó la aceptación del injerto mediante inspección visual al menos 2 veces por semana. Se determinó como rechazo la formación de una costra en la zona del injerto de piel.

### **3.14 ELISPOT**

Los ensayos de ELISPOT se realizaron utilizando los kits Mouse IFN- $\gamma$  ELISPOT Ready-SET-Go!; Mouse IL-4 ELISPOT Ready-SET-Go! y Mouse IL-17 ELISPOT

Ready-SET-Go! (eBioscience). Se utilizaron placas de 96 pozos MultiScreenHTS (Millipore).

Entre 100 a 120 días después del trasplante de piel se sacrificaron los ratones trasplantados, las células del bazo se perfundieron con RPMI + 10% FCS y se utilizaron para realizar el ensayo de ELISPOT. Se cubrieron las placas con anticuerpos de captura: anti- $\text{INF}\gamma$ , anti-IL17 o anti-IL-4 (eBioscience), y se incubaron toda la noche a 4 °C. Luego, se lavaron las placas y se dejaron bloqueando con medio RPMI 10% FCS a 37 °C durante 2 horas. Posteriormente, se eliminó el medio de la placa y se re-estimularon los esplenocitos obtenidos de los ratones trasplantados poniéndolos en cultivo con esplenocitos alogénicos (C57BL/6, H-2<sup>b</sup>) o singénicos (Balb/c, H-2<sup>d</sup> como control negativo), previamente irradiados con 30 Gy. En cada pozo, se distribuyeron 10<sup>5</sup> células de bazo de los ratones trasplantados y 10<sup>5</sup> células irradiadas. Estas células se cocultivaron en medio RPMI + 10% FCS durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera húmeda y 5% CO<sub>2</sub>. Luego, se lavó la placa para eliminar las células y, para detectar las citoquinas producidas se agregaron los anticuerpos de detección biotinilados anti- $\text{INF}\gamma$ , anti-IL17 o anti-IL-4, respectivamente, y se incubaron toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se lavó la placa y se agregó avidina conjugada a la enzima HRP, la cual se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.

Transcurrida la incubación, nuevamente se lavó la placa y se agregó el sustrato: AEC (3-amino-9-ethyl carbazole), se incubó de 5 - 60 minutos dependiendo de la detección de los spots. La reacción se detuvo lavando con agua. Los spots fueron escaneados y contados utilizando ImmunoSpot Analyzer (Cellular Technology). La frecuencia de

células secretoras de una determinada citoquina se expresó como el número de células produciendo citoquinas (SFC, spot forming cells) por cada  $10^5$  células. Todas las muestras se pusieron en triplicado en la placa.

### **3.15 Análisis estadístico**

Los gráficos, ajustes y pruebas estadísticas se hicieron con el programa GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, GraphPad, San Diego, CA). La significancia estadística se evaluó utilizando pruebas estadísticas T de *Student* de dos colas no pareadas con corrección de *Welch*, o ANOVA de una vía de medidas repetidas con *post-test de Dunnett* y, para comparaciones de más de dos variables se realizó ANOVA de dos vías. Los *p values* < 0.05 se consideraron significativos. Los datos graficados corresponden al promedio  $\pm$  SEM. Las curvas de supervivencia y la significancia de las diferencias en la supervivencia de los injertos entre los grupos se determinó mediante análisis de Kaplan-Meier, utilizando *Mantel-Cox test* y *Logrank test for trend*.

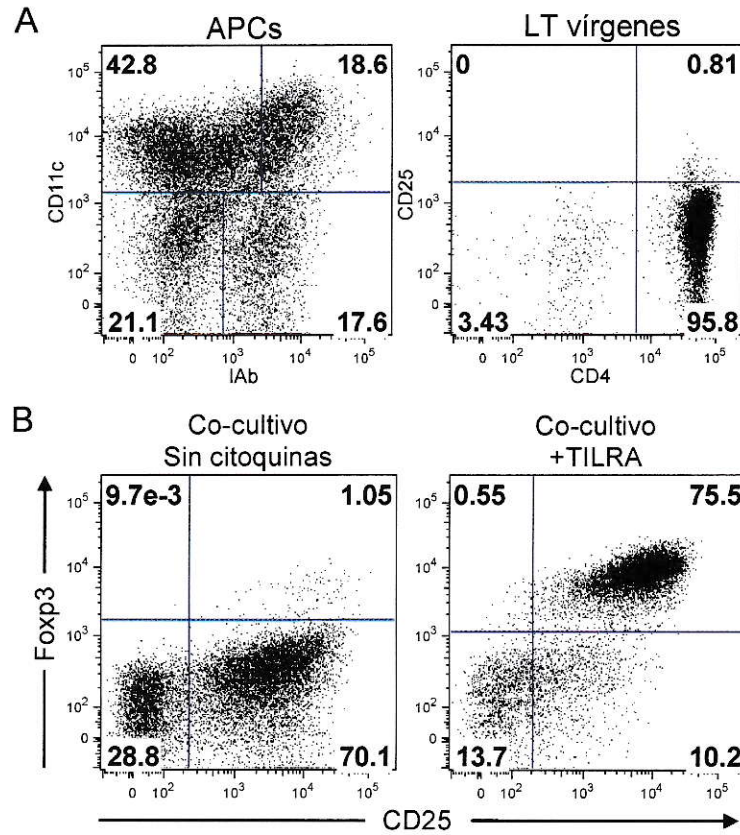
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Producción *in vitro* de LT reguladores donante-específicos

Con el propósito de inducir tolerancia inmune, generamos LT reguladores (Tregs) donante-específicos para ser utilizados como terapia celular en trasplantes. Los Tregs CD4+CD25+Foxp3+ fueron producidos a partir de LT vírgenes CD4+CD25-, utilizando como estímulo células presentadoras de antígeno (APCs) alogénicas, es decir, sólo los LT CD4+ vírgenes que reconocen las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II presentes en las APCs, son activados, proliferan y se diferencian a Tregs. Esta diferenciación ocurre eficazmente en presencia de TGF- $\beta$ , IL-2 y ácido retinoico (RA), condición que denominamos TILRA (Moore et al., 2009, 2010).

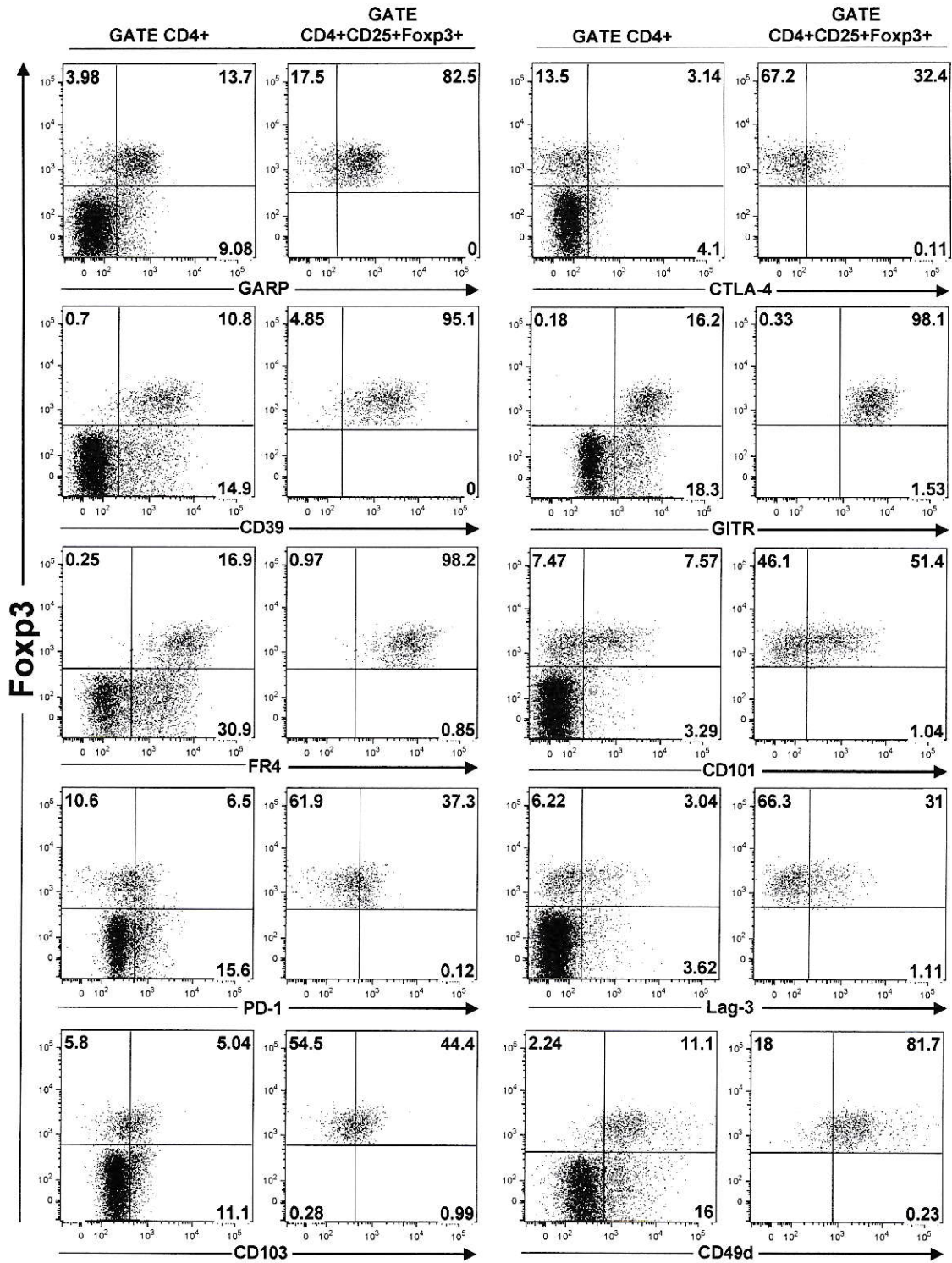
Los LT vírgenes CD4+CD25- de haplotipo H-2<sup>d</sup> del receptor (Figura 1A, derecha) fueron co-cultivados con APCs alogénicas de haplotipo H-2<sup>b</sup> del donante (Figura 1A, izquierda) en condición TILRA, o en ausencia de citoquinas como control (Figura 1B). Después de 6 días de co-cultivo 40-75% de las células CD4+ se diferencian a Tregs CD4+CD25+Foxp3+ (Figura 1 B, derecha). Además se evaluó el fenotipo de los Tregs donante-específicos, para esto se marcaron proteínas de superficie relacionadas con la actividad supresora de los Tregs y con el *homing* a tejidos. Como se muestra en la figura 2, una alta proporción de los Treg expresa GARP, CD39, GITR, FR4 y CD49d. Una menor proporción de los Treg expresa CD101 y Lag-3. Todas estas proteínas expresadas por los Tregs donante-específicos, participan en los mecanismos supresores de los Tregs,

como la disrupción metabólica (CD39), infiltración de tejidos (CD49d). También se observó que los Tregs expresan moléculas de *homing* hacia intestino, como CCR6, CCR9 y  $\alpha 4\beta 7$  (Figura 3).

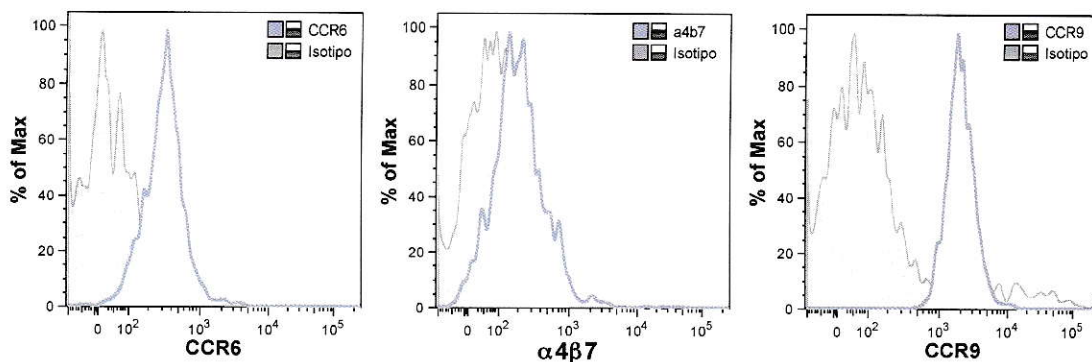


**Figura 1. Tregs donante-específicos inducidos *in vitro* en condición TILRA.** (A) Izquierda: Citometría de flujo de APCs purificadas de bazo de ratón C57BL/6. Derecha: Fenotipo de los LT vírgenes CD4+CD25- purificados de bazo de ratón Balb/c. Los números en los cuadrantes indican los porcentajes de las diferentes poblaciones. (B) Citometría de flujo del co-cultivo *in vitro* durante 6 días de LT vírgenes con APCs alogénicas. A la izquierda se muestra el fenotipo de los LT CD4+ obtenidos en un co-cultivo con APCs alogénicas sin agregar citoquinas y a la derecha, agregando TILRA. Se evaluó la expresión de Foxp3 y CD25 en una ventana para LT CD4+. Se muestra un experimento representativo.





**Figura 2. Fenotipo de Tregs inducidos *in vitro* en condición TILRA.** Citometría de flujo de Tregs obtenidos de un co-cultivo de LT vírgenes con APCs alogénicas después de 6 días. Se analizó la expresión de GARP, CTLA-4, CD39, GITR, FR4, CD101, PD-1, Lag-3, CD103 y CD49d en una ventana CD4+ (izquierda) y una ventana CD4+CD25+Foxp3+ (derecha). Los números en los cuadrantes indican los porcentajes de las poblaciones.



**Figura 3. Expresión de receptores de *homing* de Tregs inducidos *in vitro* en condición TILRA.** Citometría de flujo de Tregs obtenidos de un co-cultivo de LT vírgenes con APCs alogénicas después de 6 días. En los histogramas se muestra la expresión de los receptores de *homing* CCR6,  $\alpha 4\beta 7$  y CCR9 en una ventana CD4+CD25+Foxp3+. En gris se muestran los controles de isotipo respectivos.

#### 4.2 Estabilidad funcional de los linfocitos Tregs

En esta tesis nos propusimos generar Tregs *in vitro* para inducir tolerancia a aloantígenos *in vivo*, por lo tanto evaluamos la estabilidad y funcionalidad de los Tregs generados *in vitro* en condición TILRA, una vez administrados a los animales. Para demostrar este punto utilizamos un modelo animal experimental antígeno específico que nos permitiese evaluar la estabilidad de los Tregs *in vivo*. Por lo tanto, preparamos Tregs a partir de LT vírgenes de ratones transgénicos OT-II, cuyo TCR reconoce el péptido de ovalbúmina OVA<sub>323-339</sub> y presenta el marcador congénico CD45.2, el cual permite reconocer estas células utilizando un anticuerpo monoclonal anti-CD45.2. Por otra parte, produjimos otro tipo de Tregs a partir de un ratón [OT-II x Foxp3-GFP]F1 cuyo TCR transgénico reconoce el péptido OVA<sub>323-339</sub>, donde los Tregs expresan la proteína GFP la

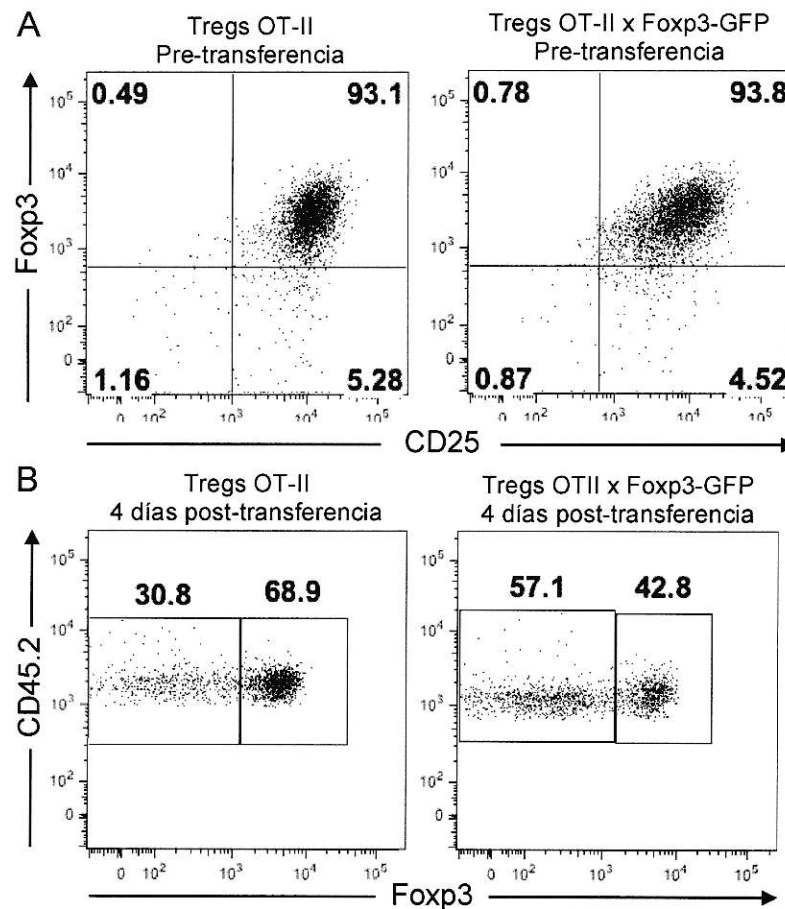
cual permite individualizar los Tregs. Este ratón expresa además los marcadores congénicos CD45.1 y CD45.2.

Los Tregs, sean de ratones OT-II u [OT-II x Foxp3-GFP]F1, fueron producidos co-cultivando LT vírgenes con APCs de ratones C57BL/6 en presencia de TILRA y anti-CD3. Después de 4 días de co-cultivo, los Tregs fueron aislados mediante *cell sorting*. Los Tregs de ratones OT-II se aislaron como células CD4+CD25<sup>high</sup> y los Tregs de ratones [OT-II x Foxp3-GFP]F1, en base a la expresión de CD4, CD25<sup>high</sup> y GFP. La figura 4A muestra que ambos tipos de Tregs fueron aislados con una pureza del 93%. Los Tregs fueron inyectados por vía endovenosa en ratones B6SJL-PTPRC (C57BL/6, CD45.1+), de este modo los Tregs inyectados (que poseen el marcador congénico CD45.2) pueden ser reconocidos en los ratones receptores. Al día siguiente de la transferencia adoptiva los ratones recibieron 1 mg OVA por vía intraperitoneal, 3 días después los ratones fueron sacrificados y se evaluó la expresión de Foxp3 en los Tregs transferidos que se encontraban en el bazo. Como se muestra en la figura 4B, aproximadamente 70% de los Tregs OT-II mantienen la expresión de Foxp3, mientras 43% de los Tregs [OT-II x Foxp3-GFP]F1 transferidos mantuvieron la expresión de Foxp3, indicando que estos últimos Tregs son menos estables.

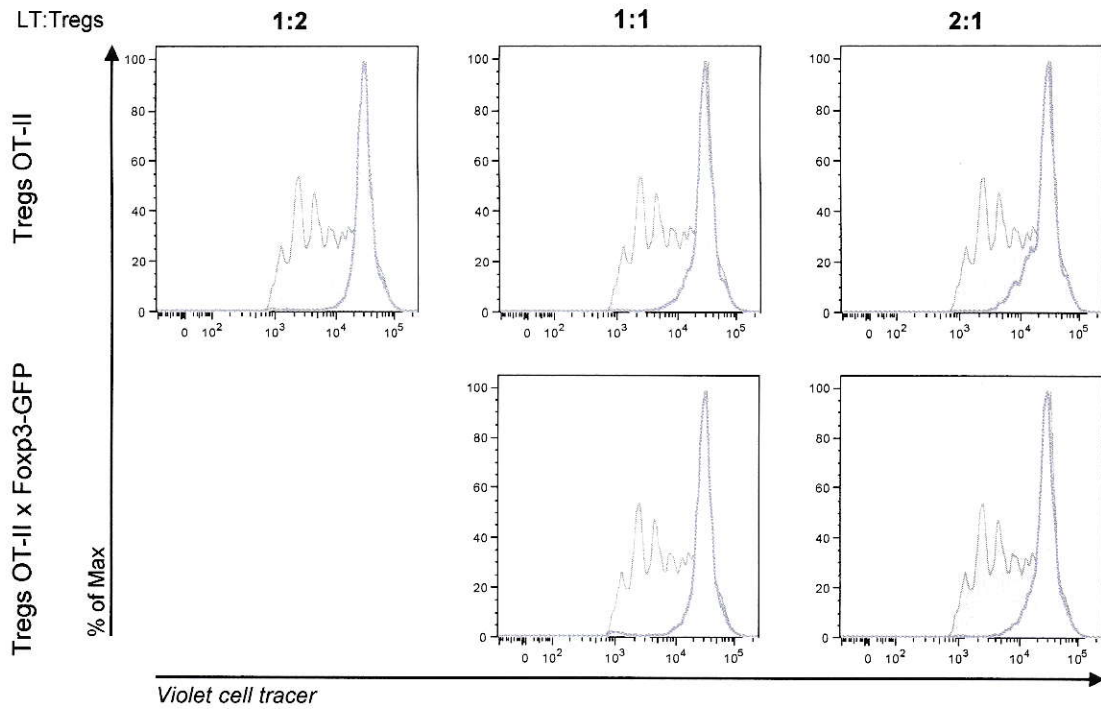
Para determinar si los Tregs OT-II (CD45.2<sup>+</sup>) y [OT-II x Foxp3-GFP]F1 (CD45.2<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>) que permanecieron durante 4 días en los ratones receptores mantienen su funcionalidad, se purificaron por *cell sorting* y se analizó su capacidad supresora. Para esto se utilizaron LT vírgenes de ratones C57BL/6, los cuales se marcaron con un trazador celular violeta (*violet cell trace*) que permite visualizar y cuantificar la proliferación. Los LT vírgenes, se activaron con APCs y anti-CD3 en presencia o

ausencia de los Tregs seleccionados previamente por *cell sorting*, los cuales habían permanecido por 4 días en ratones receptores.

La figura 5 muestra que los Tregs OT-II y [OT-II x Foxp3-GFP]F1 suprimen completamente la proliferación de los LT activados en presencia de diferentes proporciones de Tregs. Estos resultados demuestran que los Tregs generados en condición TILRA son fenotípica y funcionalmente estables, y nos permiten inferir que Tregs donante-específicos producidos de manera similar serán estables *in vivo*.



**Figura 4. Tregs transferidos adoptivamente y recuperados después de 4 días son estables. (A)** Expresión de Foxp3 en Tregs OT-II y Tregs [OT-II x Foxp3-GFP]F1 purificados por *cell sorting* previo a la transferencia adoptiva **(B)** Evaluación de la expresión de Foxp3 en Tregs OT-II y Tregs [OT-II x Foxp3-GFP]F1 4 días después de la transferencia adoptiva. El análisis se muestra en una *gate* CD45.2+



**Figura 5. Tregs transferidos adoptivamente y recuperados después de 4 días son funcionales.** Los Tregs OT-II u [OT-II x Foxp3-GFP]F1 fueron evaluados funcionalmente en un ensayo de supresión de LT efectoras. Los LT efectoras fueron marcados con un trazador de proliferación fluorescente y activados con APCs y anti-CD3. En los gráficos se sobrepone las curvas de proliferación en presencia (violeta) y ausencia (gris) de Tregs. Se usaron diferentes proporciones de LT efectoras y Tregs.

### **4.3 Inmunogenicidad de distintas combinaciones de moléculas de histocompatibilidad de ratones receptores y donantes para el establecimiento de un protocolo de trasplante de MO**

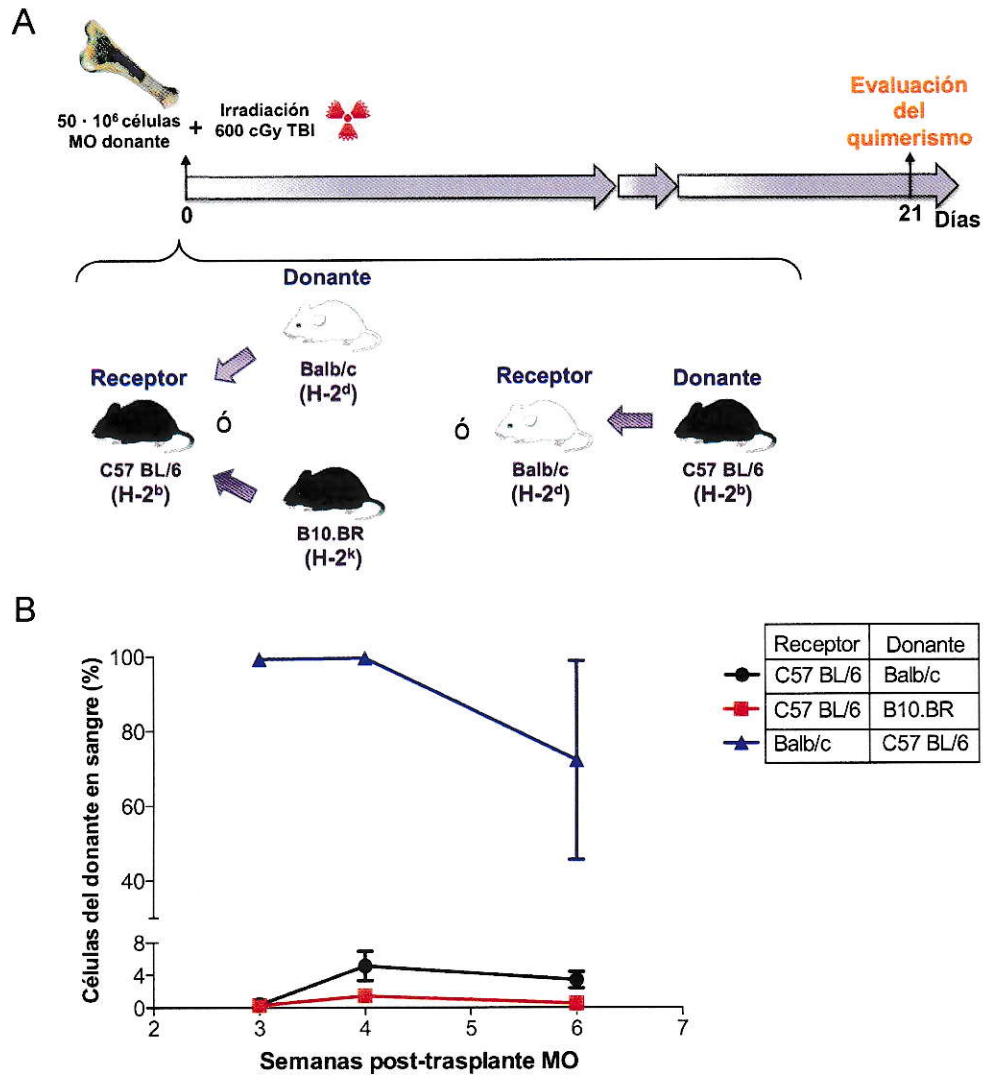
El objetivo de este trabajo es producir quimerismo mixto con las células del donante, para lograr posteriormente la aceptación de un trasplante periférico proveniente de este donante. El quimerismo mixto se produce luego de la inyección de células de médula ósea (MO) en ratones irradiados o inmunosuprimidos. El quimerismo total se logra utilizando una alta dosis de irradiación  $\gamma$  (900 cGy) y la inyección de MO del ratón donante. Nuestro objetivo es inducir quimerismo mixto utilizando un protocolo no mieloablativo, que tenga menos efectos secundarios y que sea estable en el tiempo.

En primer lugar estudiamos distintas combinaciones donante-receptor utilizando 3 cepas de ratones de distinto haplotipo H-2, 600 cGy de irradiación  $\gamma$  total del cuerpo (TBI) y una dosis de  $50 \cdot 10^6$  células de MO del donante (Figura 6A). Tres semanas después del trasplante, se evaluó mediante citometría de flujo, la presencia de células de haplotipo del donante (H-2K<sup>b</sup>, H-2K<sup>d</sup> o H-2K<sup>k</sup>) en muestras de células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMCs).

El grupo de receptores C57BL/6 que recibió MO Balb/c, presentó un porcentaje de células de haplotipo del donante (H-2K<sup>d</sup>) de  $0.39\% \pm 0.08$  en PBMCs a la semana 3 (negro), alcanzando un  $3.4\% \pm 1.0$  a la semana 6 post-trasplante de MO (Figura 6B). El grupo de receptores C57BL/6 que recibió MO B10.BR, presentó  $0.17\% \pm 0.02$  de células de haplotipo del donante (H-2K<sup>k</sup>) en PBMCs 3 semanas post-trasplante (rojo), llegando a tener  $0.4\% \pm 0.1$  de células H-2K<sup>k</sup> a la semana 6 post-trasplante de MO

(Figura 6B). Estos porcentajes no son significativamente distintos entre ambos grupos en ninguno de los tiempos medidos (semanas 3, 4 y 6) ( $p > 0.05$ , Figura 6B).

En contraste, el grupo de receptores Balb/c que recibió MO C57BL/6, presentó un  $99.1\% \pm 0.2$  de células de haplotipo del donante (H-2K<sup>b</sup>) en PBMCs a la semana 3 post-trasplante (azul), disminuyendo a un  $72\% \pm 26.7$  a la semana 6 post-trasplante MO (Figura 6B). Este grupo presentó un porcentaje significativamente mayor de células de haplotipo del donante en todos los tiempos medidos (semanas 3, 4 y 6), en comparación a la combinación inversa ( $p > 0.001$ ). Por lo tanto, como se muestra en la figura 6B, solo en la combinación receptor Balb/c – donante C57BL/6 se produce un estado de quimerismo relativamente estable en el tiempo, mientras que las combinaciones receptor C57BL/6 donante Balb/c o B10.BR no producen quimerismo mixto en los receptores. En consecuencia, los siguientes experimentos se realizaron utilizando ratones Balb/c como receptores y ratones C57BL/6 como donantes de MO.



**Figura 6. Uso de distintas combinaciones de cepas de ratones receptores y donantes para el establecimiento de un protocolo de trasplante de MO.** (A) Se muestra un esquema de los protocolos de trasplantes de MO evaluados. Los receptores fueron condicionados con una dosis de irradiación y de 600 cGy TBI y recibieron  $50 \cdot 10^6$  células de MO del donante (día 0). Se utilizaron 3 combinaciones de cepas: receptor C57BL/6 y donante Balb/c; receptor C57BL/6 y donante B10.BR; receptor Balb/c y donante C57BL/6. (B) Cuantificación del porcentaje promedio ( $\pm$  SEM) de células del donante en sangre desde 3 semanas hasta 6 semanas post-trasplante. Se muestran las combinaciones: receptor C57BL/6 - MO Balb/c (●, n=3); receptor C57BL/6 - MO B10.BR (■, n=3); y receptor Balb/c - MO C57BL/6 (▲, n=3). Los datos provienen de 1 experimento. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas usando ANOVA de dos vías con *post-test* de Bonferroni.



#### **4.4 Uso de inmunosupresores, bajas dosis de irradiación y distintas dosis de MO alogénica para el establecimiento de un protocolo de trasplante de MO no mieloablativo**

Uno de nuestros objetivos es establecer las condiciones experimentales que permitan inducir quimerismo mixto, utilizando dosis bajas de irradiación  $\gamma$  y una cantidad reducida de células de MO, para no generar rechazo producido por la enfermedad del injerto hacia el huésped (GVHD).

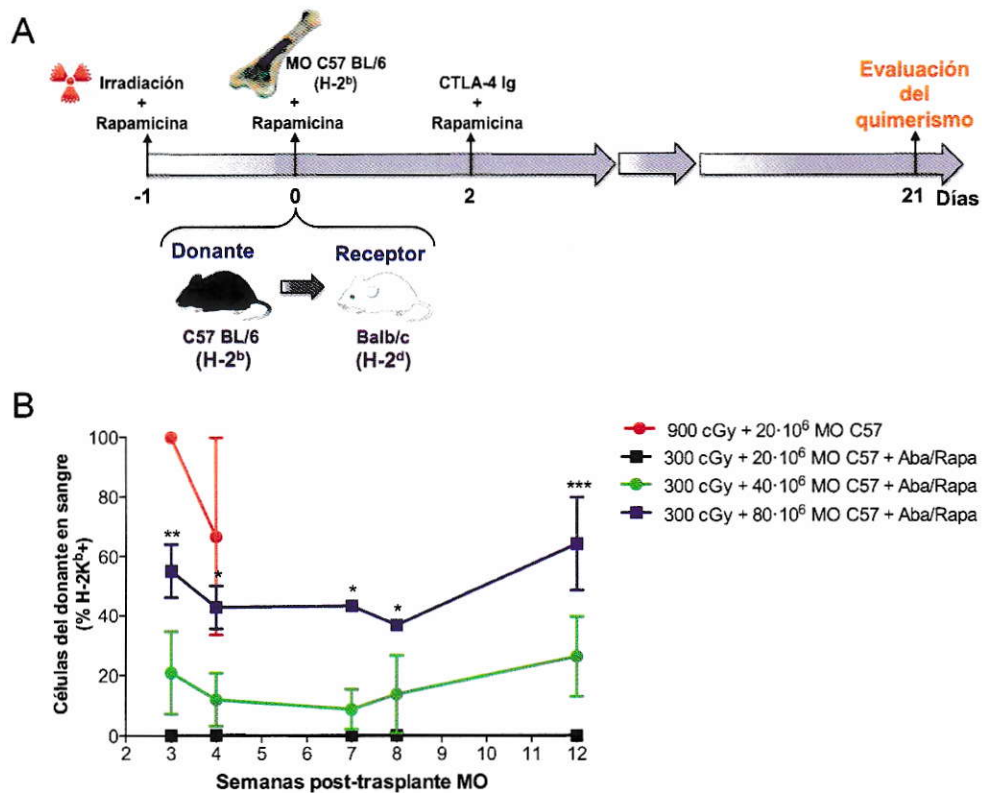
Con este objetivo, evaluamos la utilización de drogas inmunosupresoras al inicio del protocolo. Como control positivo de aceptación de la MO, se usó una dosis de irradiación  $\gamma$  de 900 cGy TBI y  $20 \cdot 10^6$  células de MO. Para el protocolo experimental (Figura 7A) se utilizó una dosis de 300 cGy TBI y dosis crecientes de  $20 \cdot 10^6$ ,  $40 \cdot 10^6$  y  $80 \cdot 10^6$  células de MO del donante. En todos los experimentos los ratones receptores fueron de la cepa Balb/c de haplotipo H-2<sup>d</sup> y los ratones donantes C57BL/6 de haplotipo H-2<sup>b</sup>. En el protocolo de inmunosupresión se administraron 3 dosis de 5 mg/kg/día de rapamicina y 1 dosis de CTLA4-Ig de 24 mg/kg/día. La primera dosis de rapamicina se administró un día antes del trasplante (día -1) al igual que la irradiación. La segunda dosis de rapamicina y la MO alogénica se administraron el día 0, y la tercera dosis de rapamicina se administró en conjunto con CTLA4-Ig, 2 días después del trasplante (día 2, Figura 7A).

El grupo control, que recibió 900 cGy TBI y  $20 \cdot 10^6$  células de MO C57BL/6, presentó un 99.5 %  $\pm$  0.2 de células del haplotipo del donante en PBMCs a la semana 3 post-trasplante y un 66.3 %  $\pm$  33.1 a las 4 semanas post-trasplante (Figura 7B). Estos ratones

aceptan la MO alogénica, por lo tanto no se continuó la evaluación de quimerismo en los ratones de este grupo.

El grupo de ratones que recibió  $80 \cdot 10^6$  células de MO C57BL/6, presentó  $54.8\% \pm 9.0$  de células de haplotipo del donante en PBMCs a la semana 3 post-trasplante. Este porcentaje se mantuvo alrededor de un 40% hasta la semana 8, y a la semana 12 post-trasplante el quimerismo fue  $63.9\% \pm 15.6$  (Figura 7B). El grupo de ratones que recibió  $40 \cdot 10^6$  células de MO C57BL/6, presentó un  $20.8\% \pm 13.7$  de células del haplotipo donante 3 semanas post-trasplante. Este porcentaje disminuyó hasta alrededor de un 10% a partir de la semana 4 y hasta la semana 8 post-trasplante, y aumentó a un  $26.2\% \pm 13.3$  a la semana 12 post-trasplante (Figura 7B). En contraste, los ratones que recibieron  $20 \cdot 10^6$  células de MO C57BL/6, rechazaron la MO alogénica, observándose un  $0.05\% \pm 0.01$  de células del haplotipo donante en PBMCs a la semana 3 post-trasplante. Este porcentaje llegó a ser de un  $0.14\% \pm 0.05$  a la semana 12 post-trasplante (Figura 7B).

En resumen, los ratones de los grupos que recibieron  $80 \cdot 10^6$  ó  $40 \cdot 10^6$  células de MO del donante presentaron quimerismo mixto, mientras que aquellos ratones que recibieron  $20 \cdot 10^6$  células de MO del donante rechazaron la médula ósea alogénica.



**Figura 7. Establecimiento de un protocolo de trasplante de MO no mieloablativo, utilizando baja dosis de irradiación, inmunosupresores y distintas dosis de MO.** (A) Se muestra un esquema de los protocolos de trasplantes de MO evaluados. Diferentes grupos de ratones Balb/c fueron condicionados con una dosis baja de irradiación y (300 cGy TBI, día-1), Rapamicina (5 mg/kg, los días -1, 0 y 2), y bloqueador de co-estimulación CTLA-4Ig (Abatacept, 24 mg/kg, día 2). El día 0 los ratones recibieron  $20 \cdot 10^6$ ,  $40 \cdot 10^6$  u  $80 \cdot 10^6$  células de MO C57BL/6. El control positivo recibió solamente 900 cGy y  $20 \cdot 10^6$  células de MO C57BL/6, el día 0. (B) Se grafica el porcentaje promedio ( $\pm$  SEM) de células del donante (H-2K<sup>b</sup>) en PBMCs, desde la semana 3 hasta las semana 12 post-trasplante de MO. Se utilizaron 3 ratones por grupo. Los datos mostrados provienen de 1 experimento. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas usando ANOVA de dos vías con *post-test* de Bonferroni. Aba: Abatacept (CTLA-4Ig); Rapa: Rapamicina.

#### **4.5 Tregs donante-específicos generados *in vitro* inducen quimerismo mixto utilizando un protocolo de trasplante de médula ósea no mieloablativo.**

Con el propósito de inducir quimerismo mixto con un protocolo de trasplante de médula ósea no mieloablativo se utilizaron Tregs donante-específicos generados *in vitro*. Se estableció como protocolo base de trasplante de médula ósea el uso de  $20 \cdot 10^6$  células de MO del donante, 300 cGy TBI de irradiación y el tratamiento inmunosupresor con rapamicina y CTLA4-Ig al inicio del trasplante, el cual no permite generar quimerismo mixto, tal como se describió en la sección anterior (Figura 7B). Nuestro objetivo fue mejorar este protocolo y producir quimerismo mixto mediante la utilización de Tregs.

Linfocitos T vírgenes CD4+CD25- de ratón Balb/c (H-2<sup>d</sup>) fueron co-cultivados con APCs alogénicas de ratón C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) en condición TILRA. Después de 6 días de co-cultivo aproximadamente el 60% de las células CD4+ son Tregs CD4+CD25+Foxp3+ (Figura 8A, izquierda). Los Tregs inducidos fueron seleccionados por *cell sorting* en base a la expresión de CD4 y CD25. La pureza de los Tregs fue mayor o igual al 90%, se verificó mediante citometría de flujo por la expresión intracelular de Foxp3, como se muestra en la figura 8A (derecha).

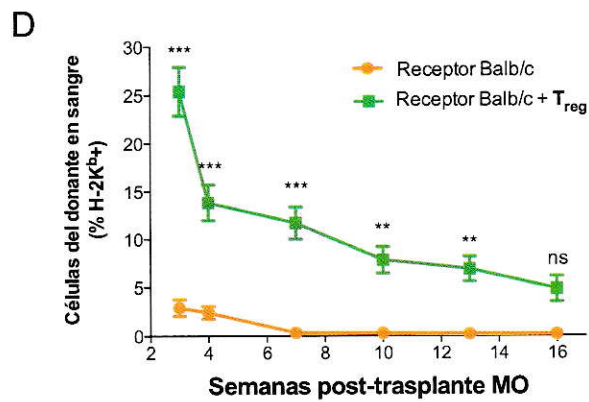
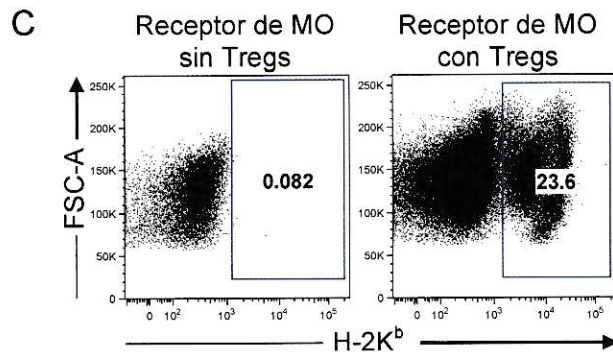
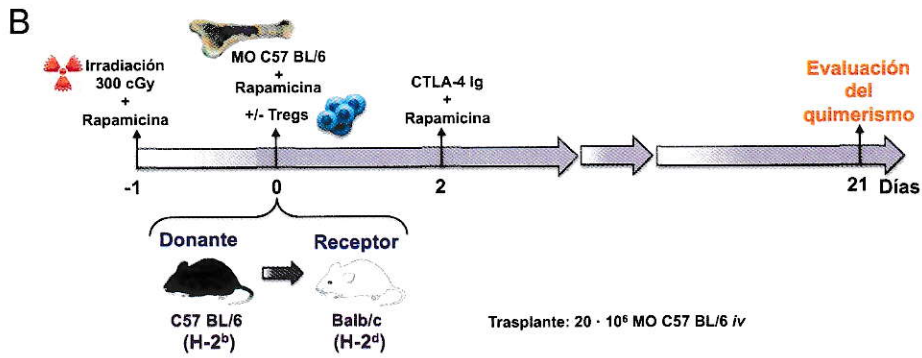
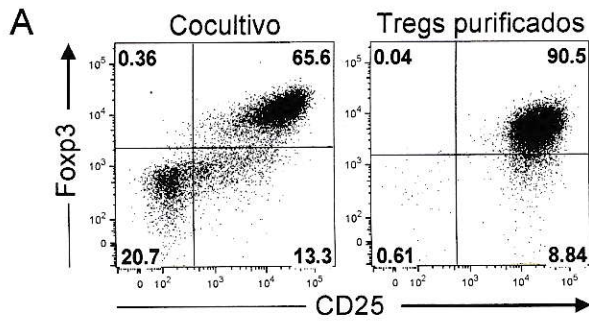
En la figura 8B se muestra un esquema del protocolo experimental, en el cual los ratones Balb/c recibieron 300 cGy TBI (día -1), 3 dosis de 5 mg/kg/día de rapamicina (días: -1, 0 y 2) y 1 dosis de 24 mg/kg/día de CTLA4-Ig (día 2). El trasplante de MO consistió en la inyección de los ratones Balb/c con una dosis endovenosa de  $20 \cdot 10^6$  células de MO de ratón C57BL/6 (día 0), mientras que los ratones del grupo experimental además recibieron  $2.2 \cdot 10^6$  Tregs (día 0). A partir de la semana 3 post-trasplante, se evaluó

mediante citometría de flujo la presencia de células de haplotipo del donante (H-2K<sup>b</sup>) en muestras de PBMCs.

En la figura 8C y 8D se muestra el efecto de los Tregs en la inducción de quimerismo mixto 3 semanas después del trasplante de MO. Los ratones que recibieron Tregs donante-específicos, aceptaron el trasplante de MO ( $p < 0.001$ , 29/29 ratones quiméricos con Tregs), presentado un  $25.4\% \pm 2.5$  de células H-2K<sup>b</sup> en PBMCs 3 semanas post-trasplante (Figuras 6C-D), mientras que los ratones trasplantados sin Tregs rechazaron el trasplante de MO (0/22 ratones quiméricos con un promedio de  $2.8\% \pm 0.9$  células H-2K<sup>b</sup>, Figura 8C-D).

El análisis de la presencia de células de haplotipo del donante (H-2K<sup>b</sup>) en muestras de PBMCs a largo plazo, demostró que el quimerismo mixto es estable en el tiempo, ya que a las 3, 4, 7, 10 y 13 semanas post-trasplante de MO todavía persiste un porcentaje significativo de células del haplotipo donante en los ratones receptores que recibieron Tregs donante-específicos, respecto del grupo control que no recibió Tregs ( $p < 0.01$ , Figura 8D).

En consecuencia, los Tregs donante-específicos inducidos *in vitro*, permitieron el establecimiento de un estado de quimerismo mixto en los ratones receptores, mediante el uso de un protocolo de trasplante de MO no mieloablativo.



**Figura 8. Tregs donante-específicos combinados con un protocolo no mieloablativo de trasplante de MO, producen quimerismo mixto.** (A) Gráficos representativos de citometría de flujo, donde los números en los cuadrantes indican el porcentaje de células en una *gate* CD4+. Izquierda: Tregs inducidos *in vitro*. Derecha: Tregs donante-específicos aislados mediante *cell sorting*. (B) Esquema experimental del protocolo de trasplante de MO no mieloablativo. Los receptores fueron condicionados con una dosis baja de irradiación  $\gamma$  (300 cGy TBI, día-1), Rapamicina (5 mg/kg, los días -1, 0 y 2), y bloqueador de co-estimulación CTLA-4Ig (Abatacept, 24 mg/kg, día 2). El día 0 los receptores recibieron  $20 \cdot 10^6$  células de MO C57BL/6 con o sin  $2.2 \cdot 10^6$  Tregs donante-específicos. (C) Tres semanas después del trasplante de MO se evaluó el quimerismo mixto de los receptores tratados con Tregs (derecha) o sin Tregs (izquierda). En la figura se muestran gráficos representativos de citometría de flujo indicando el porcentaje de células de haplotipo del donante (H-2K<sup>b</sup>) en PBMCs. (D) Se grafica el porcentaje promedio ( $\pm$  SEM) de células del donante (H-2K<sup>b</sup>) en PBMCs desde la semana 3 hasta las semana 16 post-trasplante de MO. En verde se muestra el grupo tratado con Tregs donante-específicos (■, n=29) y en naranja el grupo sin Tregs (●, n=21). Los datos provienen de 7 experimentos independientes. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas usando ANOVA de dos vías con *post-test* de Bonferroni. \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $0.001 < p < 0.01$ ; ns:  $p > 0.05$ . Rapa: Rapamicina; Aba: Abatacept (CTLA-4Ig); MO: Médula ósea.

#### 4.6 Tregs donante-específicos inducen quimerismo mixto en diversos linajes

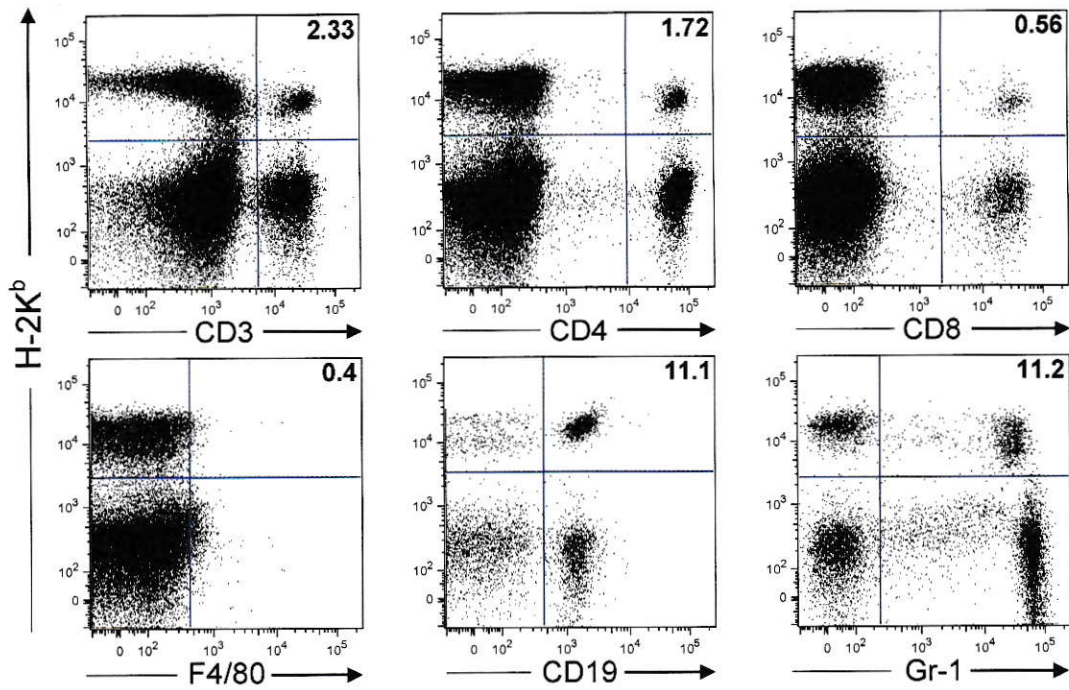
##### hematopoyéticos

Se evaluó mediante citometría de flujo la presencia de células de haplotipo del donante (H-2K<sup>b</sup>) de distintos linajes hematopoyéticos en muestras de PBMCs. Para esto se marcaron PBMCs de los ratones receptores con anticuerpos que reconocen MHC clase I de haplotipo del donante (H-2K<sup>b</sup>) en conjunto con anticuerpos anti-CD3 (linfocitos T), anti-CD4 (Linfocitos T *helper*), anti-CD8 (Linfocitos T citotóxicos), anti-CD19 (linfocitos B), anti-F4/80 (monocitos) y anti-Gr-1 (granulocitos).

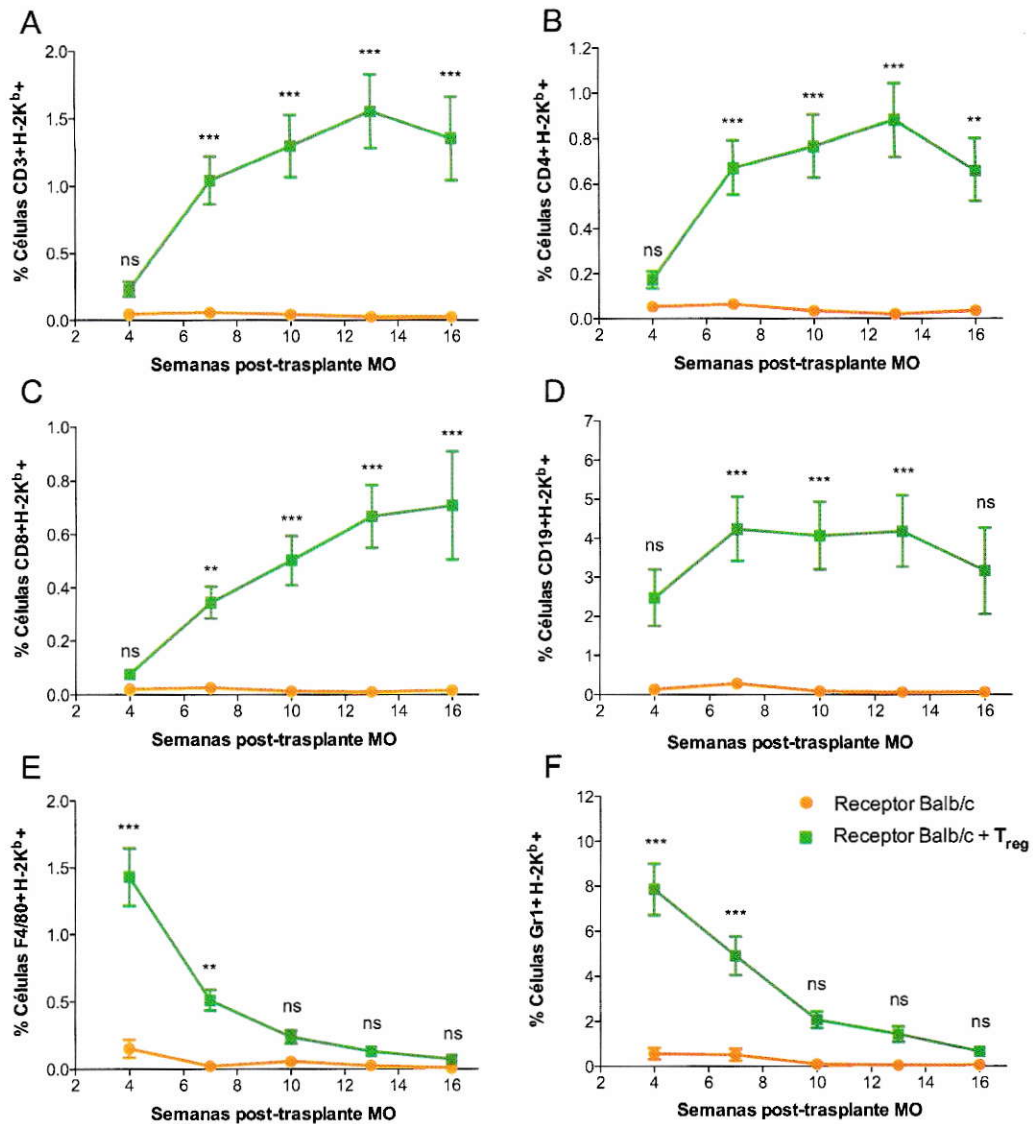
En la figura 9 se muestra que 7 semanas después del trasplante de MO, los receptores tratados con Tregs donante-específicos, presentaron linfocitos T (CD3+, 23/29 ratones,  $p < 0.001$ ), linfocitos B (CD19+, 24/29 ratones,  $p < 0.001$ ), monocitos (F4/80+, 26/29 ratones,  $p < 0.01$ ) y granulocitos (Gr-1+, 25/29 ratones,  $p < 0.001$ ) de haplotipo del donante en sangre. En consecuencia, los ratones trasplantados con células de MO alogénica y tratados con Tregs donante-específicos inducidos *in vitro*, presentaron quimerismo mixto para los diversos linajes analizados.

Por otra parte, se evaluó la reconstitución hematopoyética de la MO de los receptores con precursores del donante, para lo cual se analizaron los diversos linajes desde la semana 3 hasta la semana 16 después del trasplante de MO (Figura 10A-F). Los receptores tratados con Tregs donante-específicos, presentaron células de haplotipo del donante en el linaje de linfocitos T (12/15,  $p < 0.001$ ), incluyendo linfocitos T CD4 y linfocitos T CD8 hasta 16 semanas post-trasplante de MO, indicando que hubo una reconstitución de este linaje con precursores del donante. Además, hubo un aumento significativo de linfocitos B de haplotipo del donante hasta 13 semanas después del trasplante de MO (19/22,  $p < 0.001$ ). Sin embargo, los granulocitos y monocitos de haplotipo del donante desaparecieron casi por completo a partir de la semana 7 post-trasplante (9/15,  $p > 0.05$  para granulocitos; 1/15,  $p > 0.05$  para monocitos, Figura 10 E-F). Por lo tanto, el tratamiento con Tregs donante-específicos permitió que solo las células troncales hematopoyéticas del linaje linfoide anidaran a largo plazo en los ratones receptores.





**Figura 9. Reconstitución hematopoyética de ratones trasplantados con médula ósea y linfocitos Tregs donante-específicos.** Gráficos representativos muestran las células de haplotipo del donante (H-2K<sup>b</sup>+) en muestras de PBMCs, del linaje de linfocitos T (CD3, CD4, CD8), linfocitos B (CD19), monocitos (F4/80) y granulocitos (Gr-1) de ratones quiméricos tratados con Tregs, 7 semanas post-trasplante de MO no mieloablativo.



**Figura 10. Reconstitución hematopoyética en el tiempo de ratones trasplantados con médula ósea y linfocitos Tregs donante-específicos.** Evaluamos en el tiempo la presencia de células de haplotipo del donante (H-2K<sup>b</sup>) en diferentes linajes en PBMCs de los receptores tratados con LTregs (■, n=29) y sin LTregs (●, n=21). Se grafica: (A) Porcentaje de linfocitos T totales (CD3+). (B) Porcentaje de linfocitos T CD4. (C) Porcentaje de linfocitos T CD8. (D) Porcentaje de linfocitos B (CD19+). (E) Porcentaje de monocitos (F4/80+). (F) Porcentaje de granulocitos (Gr-1+). Se grafican los promedios ± SEM. Los datos provienen de 7 experimentos independientes. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas usando ANOVA de dos vías con *post-test* de Bonferroni. \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $0.001 < p < 0.01$ ; ns:  $p > 0.05$ .

#### **4.7 Tregs donante-específicos prolongan la sobrevida de injertos de piel alogénica**

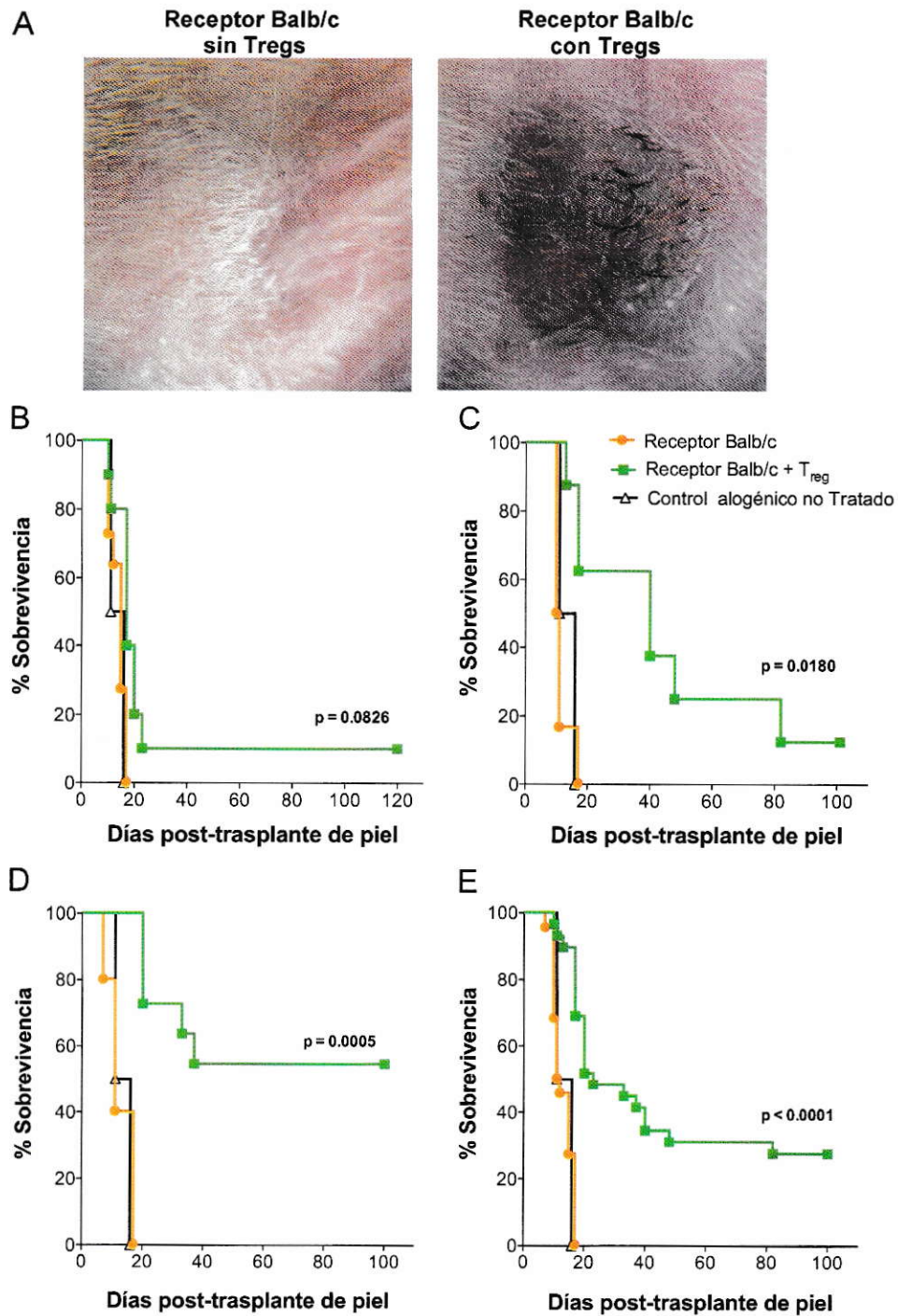
Los resultados previos muestran que los Tregs donante-específicos permiten el establecimiento de quimerismo mixto hematopoyético. A continuación, evaluamos la tolerancia de los ratones trasplantados de MO a injertos de piel alogénica. Para esto a las 4, 7 ó 13 semanas después del trasplante de MO se trasplantaron los ratones con injertos de piel del mismo haplotipo de la MO alogénica trasplantada. La figura 11A muestra la aceptación de un injerto de piel alogénica en un ratón tratado con Tregs donante-específicos. Las imágenes muestran que el receptor acondicionado sin Tregs presenta una cicatriz 57 días post-trasplante de piel (Figura 11A, izquierda), mientras que el ratón acondicionado con Tregs conserva el injerto de piel alogénica, como lo muestra la presencia de pelo negro en la zona donde se realizó el trasplante (Figura 11A, derecha). El grupo de receptores tratados con Tregs donante-específicos, presentó un aumento significativo de la sobrevida de los injertos de piel alogénica (8/29) respecto al grupo control sin Tregs (0/22) ( $p < 0.0001$ , Figura 11E), sin requerir el uso de inmunosupresión adicional. El MST (*median survival time*) de los injertos de piel fue de 23 días en el grupo tratado con Tregs donante-específicos, mientras que en el grupo sin Tregs fue de 11.5 días.

Por otra parte, analizamos el efecto del lapso de tiempo transcurrido entre el trasplante de médula ósea y el momento en el que se realiza el trasplante de piel sobre la sobrevida del injerto. Cuando el trasplante de piel alogénica fue realizado 13 semanas después del trasplante de MO, no se observó una sobrevida significativa de los injertos de piel en receptores tratados con y sin Tregs ( $p = 0.0826$ , Figura 11B).

En contraste, cuando el trasplante de piel fue realizado 7 semanas post-trasplante de MO (Figura 11C), se observó un aumento significativo de la sobrevida de la piel injertada en el grupo de ratones que recibió Tregs respecto al grupo sin Tregs ( $p = 0.018$ ). El porcentaje de sobrevida de los injertos de piel en los ratones tratados con Tregs fue de 12.5% 100 días después del trasplante de piel y el MST de 40 días, mientras el MST de los injertos del grupo acondicionado sin Tregs fue de 10.5 días.

Cuando el trasplante de piel se realizó 4 semanas post-trasplante de MO (Figura 11D), aumentó significativamente la sobrevida del injerto de piel alogénica en el grupo tratado con Tregs donante-específicos respecto al grupo sin Tregs ( $p = 0.0005$ ), y el porcentaje de sobrevida del aloinjerto fue 54.5% 100 días post-trasplante de piel.

En conclusión, la sobrevida de los injertos alogénicos fue mayor cuando el trasplante de piel fue más próximo al trasplante de MO ( $p = 0.0063$ , *logrank test for trend*). Además observamos que la sobrevida de los injertos de piel del donante fue prolongada significativamente en los receptores tratados con Tregs donante-específicos ( $p < 0.0001$ , Figura 11E), es decir, en aquellos ratones en los cuales se produce quimerismo mixto comparado con los ratones en los que no se produce quimerismo mixto.



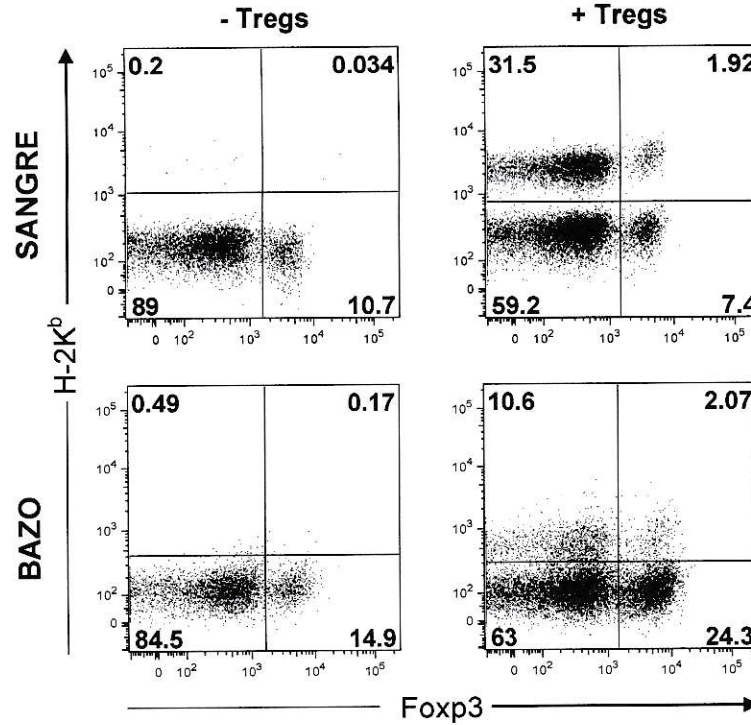
**Figura 11. Receptores de MO alógena tratados con Tregs presentan un aumento en la sobrevida de los aloinjertos de piel.** Ratones Balb/c trasplantados de MO recibieron injertos de piel alógena de un donante C57BL/6. (A) Fotografías representativas de injerto de piel 57 días post-trasplante de piel, en

receptores de MO acondicionados sin Tregs (izquierda) y con Tregs (derecha). **(B-E)** Gráficos de sobrevida de la piel alogénica injertada **(B)** 13 semanas post-trasplante de MO en receptores tratados con Tregs (■, n=10) y sin LTregs (●, n=11). Los datos provienen de 3 experimentos independientes. **(C)** 7 semanas post-trasplante de MO en receptores tratados con Tregs (■, n=8) y sin Tregs (●, n=6). Datos provenientes de 2 experimentos independientes. **(D)** 4 semanas post-trasplante de MO en receptores tratados con Tregs (■, n=11) y sin Tregs (●, n=5). Datos provenientes de 2 experimentos independientes. **(E)** Gráfico de sobrevida de la piel alogénica injertada a las semanas 4, 7 y 13 post-trasplante de MO en receptores tratados con Tregs (■, n=29) y sin LTregs (●, n=21). Datos provenientes de 7 experimentos independientes. En todos los gráficos se utilizó como control negativo, un receptor Balb/c no tratado que recibió piel alogénica de C57BL/6 ( $\Delta$ , n=3). La sobrevida fue calculada de acuerdo al método del producto límite de Kaplan-Meier y se comparó entre los grupos utilizando Mantel-Cox test (*Logrank test*). Los *p-values* se muestran en cada gráfico. La sobrevida de los injertos fue monitoreada diariamente mediante evaluación de signos macroscópicos de rechazo

#### 4.8 Ratones quiméricos presentan Tregs de origen alogénico

Para evaluar el rol de los Tregs en la tolerancia de los ratones trasplantados de MO, se determinó la presencia de Tregs de haplotipo del donante (H-2K<sup>b</sup>) en muestras de células de bazo y PBMCs de los ratones receptores. Para esto se marcaron las células de bazo y sangre con anticuerpos anti-CD4, anti-CD25, anti-Foxp3 y anti-H-2K<sup>b</sup>.

Los ratones quiméricos que fueron tratados con Tregs donante-específicos, presentaron Tregs de haplotipo del donante hasta 120 días después del trasplante de MO (4/11 en PBMCs y 4/13 en bazo, Figura 12 derecha). Todos los ratones tratados con Tregs, que mantuvieron el quimerismo después de 120, tenían Tregs de haplotipo del donante (5/5), mientras que el resultado fue negativo en los ratones que no recibieron Tregs donante-específicos (Figura 12, izquierda). Este resultado sugiere que la presencia de Tregs de origen del donante puede jugar un rol en la mantención del trasplante de piel.



**Figura 12. Receptores de MO alogénica tratados con Tregs donante-específicos presentan Tregs de haplotipo del donante en PBMCs y bazo.** Se evaluó la presencia de Tregs Foxp3<sup>+</sup> de haplotipo del donante (H-2<sup>b</sup>) en PBMCs y bazo de ratones quiméricos 100 días después del trasplante de piel. Se muestran gráficos de puntos representativos del marcaje inmunofluorescente de PBMCs (arriba) y células de bazo (abajo), dentro de una *gate* CD4<sup>+</sup>. A la izquierda se muestra marcaje de un receptor trasplantado de MO sin Tregs y a la derecha un receptor de MO tratado con Tregs.

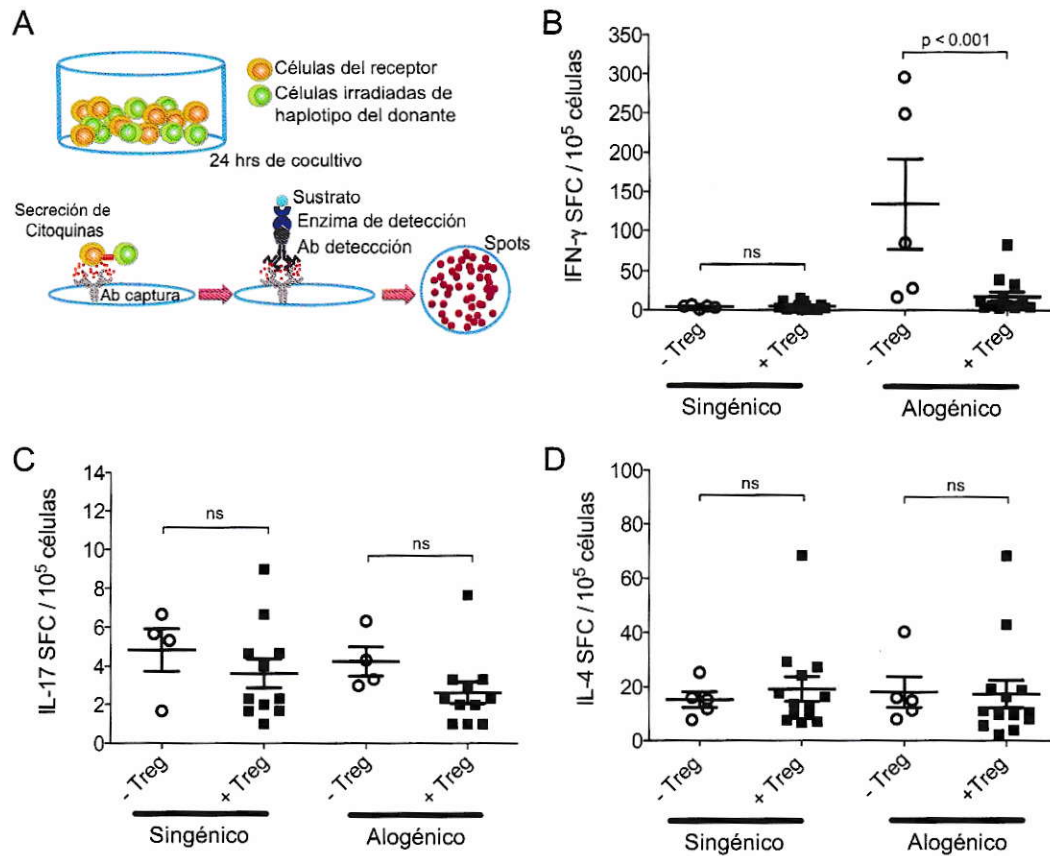
#### **4.9 Ratones receptores de MO alogénica y Tregs donante-específicos presentan una producción reducida de IFN- $\gamma$ frente a un estímulo alogénico**

El rechazo de los órganos trasplantados involucra una serie de respuestas mediadas tanto por el sistema inmune innato como por el adaptativo. Se ha determinado que el rechazo mediado por respuesta celular inmune puede involucrar linfocitos Th1, Th2, Th17 y linfocitos T citotóxicos CD8+, entre otros. Para determinar si el tratamiento de los receptores con Tregs donante-específicos tiene un efecto en la respuesta inmune celular, se evaluó mediante ELISPOT la producción de citoquinas específicas para las diferentes subpoblaciones de linfocitos T. Para esto, aproximadamente 100 días después del trasplante de piel, se sacrificaron los ratones trasplantados, se aislaron las células de bazo y se estimularon *in vitro* con células de bazo singénicas o alogénicas irradiadas (30 Gy). Como controles se usaron células de bazo de los ratones trasplantados sin Tregs. Se cuantificó el número de *spots* para IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-17 (Figura 13A).

Los esplenocitos de ratones trasplantados de MO sin Tregs gatillaron una fuerte respuesta celular frente al estímulo alogénico, mientras que los esplenocitos de los receptores tratados con Tregs donante-específicos no generaron una respuesta celular inmune contra las células del donante (Figura 13B), como se muestra en la disminución significativa del número de células que secretan IFN- $\gamma$  comparado con los esplenocitos de los ratones que no recibieron Tregs ( $p < 0.001$ ). La figura 13B muestra que la respuesta de los esplenocitos de receptores tratados con Tregs donante-específicos es similar a la detectada con esplenocitos singénicos ( $p > 0.05$ ). Este resultado indica que



en los receptores de MO tratados con Tregs donante-específicos se inducen mecanismos de tolerancia que evitan una respuesta alógena efectora de células que secretan IFN- $\gamma$ . En contraste, no se detectaron diferencias significativas en el número de células que secretaron IL-17 e IL-4 entre el grupo que recibió Tregs donante-específicos y el que no las recibió (Figura 13C-D). Del mismo modo, se observó que no hay diferencias significativas entre las respuestas gatilladas frente al estímulo alógeno o singénico, lo cual indica que no hay una respuesta celular mediada por Th17 y Th2 en el rechazo del aloinjerto.



**Figura 13. Los linfocitos T de ratones trasplantados de MO tratados con Tregs donante-específicos no producen citoquinas de tipo Th1, Th2 ni Th17.** Cien días post-trasplante de piel se midió mediante ELISPOT la secreción de IFN-  $\gamma$ , IL-17 e IL-4 en los ratones trasplantados. **(A)** Diagrama del ensayo de ELISPOT. Se co-cultivaron durante 24 horas esplenocitos de ratones trasplantados con esplenocitos irradiados de la cepa C57BL/6 (allogénica) o de cepa Balb/c (singénica). Las citoquinas secretadas por células efectoras son capturadas por un anticuerpo específico para una determinada citoquina el cual se encuentra unido a una membrana. Los spots de las células que secretan las citoquinas son revelados mediante anticuerpos y enzimas de detección. Cada spot, corresponde a una célula que secreta citoquinas. **(B)** Cuantificación del número de células (spots) de ratones trasplantados de MO que producen IFN-  $\gamma$ , sin Tregs (O, - Treg, n=5) y con Tregs (■, + Treg, n=13), **(C)** IL-17, sin Tregs (O, - Treg, n=4) y con Tregs (■, + Treg, n=11) y **(D)** IL-4, sin Tregs (O, - Treg, n=5) y con Tregs (■, + Treg, n=13). Se grafica SFC (spot forming cells)/100 000 células, las barras de error corresponden al SEM. Los datos provienen de tres experimentos independientes, todas las muestras fueron probadas en triplicado. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas usando ANOVA de dos vías con *post-test* de Bonferroni. ns:  $p > 0.05$ .

## 5. DISCUSION

Los Tregs donante-específicos generados en este trabajo, son inducidos a partir de un repertorio policlonal de linfocitos T vírgenes, donde el estímulo alogénico de las APCs constituye el único mecanismo de activación de los LT. Se ha descrito que los Tregs inducidos mediante exposición a APCs alogénicas en condición TILRA presentan una actividad supresora aloantígeno específica, suprimiendo de forma específica la respuesta efectora de LT activados con APCs del mismo haplotipo de la especificidad antigénica de los Tregs, pero no la activación mediada por APCs alogénicas de una tercera cepa (Sela et al., 2011, Moore et al., datos no publicados).

Aunque los Tregs generados *ex vivo* tienen un uso potencial como terapia celular en trasplantes, el éxito de esta aproximación depende de varios factores, tales como la generación de una cantidad suficiente de Tregs, su supervivencia *in vivo*, su migración *in vivo* a sitios de aloreactividad, la preservación de la expresión de Foxp3 después del reconocimiento de los antígenos *in vivo* y la mantención de su capacidad supresora.

Se han desarrollado diversos protocolos para inducir Tregs *in vitro*, entre los que se ha descrito que la combinación de TGF- $\beta$  y RA aumenta significativamente la inducción de Tregs *in vitro* (Xiao et al., 2008). Entre los métodos más eficientes para producir Tregs *in vitro*, están la expansión policlonal de nTregs utilizando IL-2, anti-CD3 y anti-CD28, y la inducción de Tregs mediante la activación de LT vírgenes con DCs y anti-CD3 (Godfrey et al., 2004; Taylor et al., 2002; Xia et al., 2009). Sin embargo, ambas estrategias generan o expanden Tregs de una manera policlonal, por lo

tanto no hay enriquecimiento de Tregs que reconocen un antígeno particular, en este caso antígenos del donante. El porcentaje de Tregs donante-específicos generados mediante el co-cultivo de LT vírgenes y APC alogénicas fluctúa entre 2% a 20% de los LT CD4+, si se utilizan las combinaciones TGF- $\beta$  + RA o TGF- $\beta$  + IL-2 (Moore et al., datos no publicados). Sin embargo, al utilizar la combinación de TGF- $\beta$ , IL-2 y RA el porcentaje de Tregs donante-específicos generados fluctúa entre 60 % a 70 % de los LT CD4+, similar al porcentaje observado en una inducción policlonal, obteniéndose  $0.12 \cdot 10^6$  Tregs donante-específicos por cada  $0.14 \cdot 10^6$  LT vírgenes cultivados (Figura 1B y Moore et al., datos no publicados). Los Tregs donante-específicos generados con nuestro protocolo expresan las proteínas de membrana GARP, GITR, FR4, CD101, CD103, CD39, Lag-3, CCR9, CCR6,  $\alpha 4\beta 7$  y CD49d, las cuales están relacionadas con la actividad supresora, infiltración de tejidos y el *homing* de los Tregs. También se ha demostrado que estos Tregs donante-específicos suprimen la proliferación de LT *in vitro* e inhiben la producción de IL-6, IL-17, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 (Moore et al., datos no publicados). Sin embargo, no se ha realizado un uso extensivo de Tregs inducidos *in vitro* debido a la plasticidad de los Tregs, los cuales disminuyen la expresión de Foxp3 en el contexto de inflamación (Yang et al., 2008; X. Zhou et al., 2009; Zhou et al., 2009). Del mismo modo, se ha mostrado que nTregs estimulados *in vitro*, producen IL-17 luego de ser expuestos a IL-6 (Xu et al., 2007).

En este trabajo evaluamos *in vivo* la estabilidad fenotípica y funcional de Tregs antígeno específicos generados en condición TILRA, los cuales fueron transferidos adoptivamente a un animal receptor y recuperados 4 días después. El análisis de Foxp3 y

los ensayos de supresión demostraron que los Tregs inducidos *in vitro* en presencia de RA, mantienen la expresión de Foxp3 y conservan la capacidad de suprimir la proliferación de LT efectores *in vitro*. Por lo tanto, los Tregs generados *in vitro* son estables y funcionales, y podrían ser usados en protocolos de terapia celular.

Nuestros resultados muestran que los Tregs donante-específicos inducen tolerancia a la médula ósea alogénica trasplantada, permitiendo la generación de quimerismo mixto, que a su vez permite la aceptación de un injerto de piel alogénico bajo un régimen de condicionamiento no mieloablativo. El protocolo de condicionamiento no mieloablativo óptimo consistió en el uso de una baja dosis de irradiación total del cuerpo (300 cGy TBI), un tratamiento de corto plazo con la droga inmunosupresora Rapamicina, y el bloqueo de la vía de co-estimulación CD28-CD80/86 con CTLA-4Ig (Abatacept). Además, demostramos que el uso de Tregs donante-específicos en este protocolo de condicionamiento no mieloablativo aumenta significativamente el periodo de sobrevida de injertos de piel alogénica en ratones.

El protocolo establecido en este estudio tiene notables ventajas respecto a otros protocolos de trasplante de MO, ya que permite inducir quimerismo mixto en una combinación de cepas completamente incompatibles usando una dosis reducida de MO y un condicionamiento de baja inmunosupresión. Otros protocolos utilizados por distintos grupos para inducir quimerismo entre cepas incompatibles, han requerido la utilización de altas dosis de irradiación (Joffre et al., 2008; Joffre et al., 2004), altas dosis de médula ósea (Lin et al., 2012; Sykes et al., 1997), inmunosupresores que causan toxicidad y utilización de Tregs policlonales, todas ellas condiciones que resultan incompatibles con su traslado al uso clínico.

Teniendo en consideración lo anteriormente expuesto, en este trabajo desarrollamos un protocolo que pueda ser aplicado en clínica humana, por lo tanto se mejoraron varios aspectos críticos, como el uso de una dosis aceptable de MO, uso reducido de drogas inmunosupresoras y utilización de dosis no citoreductoras de irradiación. El uso de Rapamicina y CTLA-4Ig (Abatacept) permitió reducir la irradiación de cuerpo completo de 900 cGy a una dosis no mieloablativa de 300 cGy, lo cual constituye un condicionamiento no citorreductor que disminuye los riesgos de la mieloablación e inmunosupresión utilizada en otros protocolos para inducir quimerismo mixto (Vriesendorp, 2003). Otros investigadores han realizado trasplantes de MO combinando 500 cGy de irradiación total de cuerpo y Tregs donante-específicos, demostrando que éstos inhiben específicamente la acción de los LT efectores *in vivo* (Joffre et al., 2008), y que permiten establecer tolerancia a un trasplante de piel alogénica (Golshayan et al., 2007; Joffre et al., 2008). Estas investigaciones han demostrado la especificidad y ventajas del uso de Tregs donante-específicos, sin embargo, han utilizado altas dosis de irradiación (Joffre et al., 2008) o timectomización e inducción de linfopenia (Golshayan et al., 2007) en los receptores. El uso de altas dosis de irradiación y la inducción de linfopenia son críticas y limita la aplicación futura de este tipo de protocolos en humanos (Vriesendorp, 2003).

El grupo de Meerwijk (Joffre et al., 2008) demostró que los Tregs donante-específicos, obtenidos a través de la expansión de Tregs CD4+CD25+Foxp3+ de bazo con APCs e IL-2, permiten la anidación selectiva de MO alogénica, favoreciendo una anidación preferencial de MO del mismo haplotipo que la especificidad antigénica de los Tregs generados, mientras que la MO de una tercera cepa fue rechazada (Joffre et al.,

2008). Por lo tanto, los Tregs donante-específicos establecen tolerancia a las células o tejidos del donante, permitiendo conservar la capacidad de responder a antígenos externos. Otro tipo de células reguladoras como los Tregs doble negativos CD4-CD8-, han sido aislados de bazo y activados *in vitro* con anti-CD3 en presencia de IL-2. Estas células también se han usado para inducir quimerismo mixto en modelos murinos, permitiendo la aceptación de un injerto de piel de forma donante-específica, conservando la capacidad de responder a una tercera cepa (Su et al., 2012). De este modo, el uso de Tregs donante-específicos concuerda con el desafío planteado de inducir tolerancia a injertos alogénicos sin inducir supresión generalizada de la respuesta inmune, una preocupación que no puede ser descartada cuando se utilizan Tregs policlonales.

En contraste, el uso de Tregs policlonales mantiene el riesgo de una inmunosupresión no específica que podría contribuir a los efectos perjudiciales del condicionamiento requerido para inducir quimerismo mixto, como el riesgo de contraer infecciones oportunistas o el desarrollo de tumores (Horner et al., 2008; Wekerle & Sykes, 2001).

En otro reporte, Pilat et al. probaron 3 estrategias para obtener Tregs: transfección de LT CD4+ con vector retroviral codificando Foxp3, activación policlonal de LT CD4+ en presencia de IL-2 y TGF- $\beta$ , y expansión policlonal de Tregs CD4+CD25+ en presencia de IL-2 (Pilat et al., 2010). En este estudio, los Tregs fueron usados en combinación con rapamicina y bloqueadores de las vías de coestimulación de CD28-CD80/86 (CTLA-4Ig) y CD40-CD154 (anti-CD40L mAb) como

condicionamiento no mieloablativo, evitando el uso de radiación. Sin embargo, todas estas condiciones tienen la desventaja de utilizar Tregs policlonales, además el uso de anti-CD40L genera trombosis, entre otros efectos colaterales (Sidiropoulos & Boumpas, 2004) y su uso está restringido a procedimientos experimentales, impidiendo el traslado de estos protocolos al uso clínico en humanos.

En contraste con los protocolos usados por otros grupos, el protocolo establecido en nuestro estudio provee una combinación clínicamente accesible de Tregs donante-específicos inducidos *in vitro* y un condicionamiento no citoreductor con drogas disponibles para uso en humanos, permitiendo así controlar la respuesta alodérmica de forma específica, y sin generar toxicidad en el receptor.

El quimerismo mixto inducido en el tratamiento con Tregs donante-específicos permitió la reconstitución de todas las poblaciones celulares hematopoyéticas normalmente encontradas en PBMC del donante. En la mayoría de los ratones, el quimerismo mixto se mantuvo hasta 110 días post-trasplante de MO (17/26 ratones quiméricos). El porcentaje de linfocitos se mantuvo estable o aumentó en el tiempo, mientras los monocitos y granulocitos tendieron a disminuir. Las razones del cambio del porcentaje de células mieloides en el tiempo no han sido dilucidadas, sin embargo, el establecimiento de tolerancia ha sido asociado con la presencia de linfocitos T del donante en el receptor (Umemura et al., 2004; Xu et al., 2004). Se ha demostrado que la tolerancia inducida por el quimerismo mixto puede ser revertida mediante la eliminación de LT CD4+ del donante (Adams et al., 2001; Taylor et al., 2001). Nuestros resultados concuerdan con estos autores, pues observamos que los ratones quiméricos presentan linfocitos T del donante y son tolerantes a injertos de piel alodérmica. Sin embargo, no



podemos concluir si la sobrevida de los injertos de piel se debió a la anidación de las células troncales hematopoyéticas de linaje linfoide o si se debió a una expansión de linfocitos T maduros introducidos junto a la transferencia de Tregs. La disminución de las poblaciones mieloides podría ser un factor irrelevante en el establecimiento de tolerancia, aunque el fenómeno no puede ser completamente ignorado.

En este trabajo, se determinó que la sobrevida de los injertos de piel del donante es prolongada en los receptores tratados con Tregs donante-específicos que presentaron quimerismo mixto. Además, se determinó que esta sobrevida de los injertos alogénicos aumenta cuando el trasplante de piel se realiza próximo al trasplante de MO. Esto puede deberse al mayor porcentaje de quimerismo que presentan los receptores durante las primeras 7 semanas post-trasplante de MO. Dada la disminución del porcentaje de quimerismo en el tiempo, la realización tardía del trasplante de piel respecto al trasplante de MO podría conducir a un nivel de quimerismo insuficiente para inducir tolerancia en el momento del trasplante de piel. Por otra parte, es posible que los Tregs donante-específicos tengan un efecto directo sobre el trasplante de piel cuando el trasplante se realiza tempranamente. El grupo de R. Steinman demostró que los Tregs donante-específicos inducidos *in vitro* en presencia de RA perduran por 6 meses después de haber sido transferidos a un ratón (Sela et al., 2011), por lo tanto la prolongación de la sobrevida de los aloinjertos debida a la presencia de los Tregs transferidos no puede ser completamente descartada. Sin embargo, se puede descartar la reconstitución incompleta de las poblaciones hematopoyéticas del receptor, ya que los niveles de reconstitución fueron similares en todos los tiempos entre el grupo que fue tratado con Tregs donante-específicos y el que no. En consecuencia, la tolerancia al injerto de piel puede ser

mejorada realizando los trasplantes de piel en periodos más tempranos cuando los niveles de quimerismo son más altos, como se ha observado en reportes previos (Lin et al., 2012).

Se ha demostrado ampliamente que los Tregs producen tolerancia y controlan la respuesta inmune efectora (Li & Turka, 2010; Sakaguchi et al., 2008; Sakaguchi, 2004), además la presencia de Tregs de origen del donante inhibe la GVHD en protocolos de trasplante de MO en modelos murinos (Hoffmann et al., 2002; Taylor et al., 2002). Como resultado del tratamiento con Tregs donante-específicos observamos que los ratones quiméricos presentaron Tregs de origen del donante desde 50 días post-trasplante de MO en sangre y hasta 120 días post-trasplante de MO en sangre y bazo. Estos Tregs de haplotipo del donante podrían mediar mecanismos de tolerancia a los aloinjertos y además impedir la generación de GVHD, resultado relevante ya que uno de los principales problemas de la utilización de trasplante de MO como medio para inducir tolerancia inmune es la generación de GVHD (Blazar et al., 2012), enfermedad que no fue observada utilizando nuestro protocolo. Por otra parte, se ha demostrado que pese a que los Tregs naturales y los Tregs inducidos *in vivo* presentan características fenotípicas y transcripcionales prácticamente idénticas, el repertorio de TCRs tiene mínimas similitudes entre ambos tipos de Tregs, de forma que los Tregs inducidos son un grupo de células reguladoras no redundantes que suplementan los Tregs naturales, mediante la expansión de la diversidad de TCRs dentro de la respuesta reguladora (Haribhai et al., 2011). Este fenómeno es notable en el contexto del trasplante, debido a que los Tregs de origen del donante inducidos en los receptores quiméricos podrían participar en mecanismos periféricos de tolerancia y mediar el control del GVHD. Esta

enfermedad, junto al condicionamiento inmunosupresor de los receptores, requerido para la aceptación de la MO, constituye una de las principales barreras para utilizar la inducción de quimerismo mixto como medio para inducir tolerancia inmunológica (Li & Sykes, 2012).

En este trabajo demostramos la existencia de Tregs de haplotipo del donante en los receptores tratados con Treg donante-específicos. Es interesante conocer el origen de estos Tregs, sin embargo no pudimos determinar si los Tregs fueron inducidos mediante mecanismos de tolerancia central en el timo, o si se diferenciaron en la periferia a partir de LT CD4+, o si se expandieron a partir de Tregs provenientes de la MO injertada del donante. En la literatura se ha descrito que las células dendríticas plasmocitoides pueden llevar antígenos desde los tejidos periféricos al timo, permitiendo la inducción de Tregs (Hadeiba et al., 2012; Trani et al., 2013). Los eventos de inducción de tolerancia central o periférica de Tregs de origen del donante necesitan ser evaluados en nuestro modelo, mediante el análisis de los Tregs presentes en el timo.

La inducción de Tregs no constituye el único mecanismo mediante el cual se puede inducir tolerancia a través del quimerismo mixto. Muchos reportes describen que la inducción de tolerancia inmunológica mediante el quimerismo mixto ocurre mediante la eliminación de linfocitos T aloreactivos en un proceso de tolerancia central. En las quimeras mixtas, los aloantígenos forman parte del nuevo repertorio de antígenos propios, por lo tanto hay una eliminación de los clones de linfocitos T aloreactivos (Bigenzahn et al., 2005; Domenig et al., 2013; Wekerle et al., 1998; Wekerle et al., 2000). Recíprocamente, los LT aloreactivos del donante son eliminados mediante delección clonal en el timo, así el nuevo repertorio de LT desarrollado en las quimeras es

tolerante a los antígenos del donante y el receptor. Debido a esta selección clonal de los LT no aloreactivos en el estado de quimerismo mixto, esta es una mejor aproximación para la inducción de tolerancia inmune que un cambio hematopoyético completo (donde todas las células hematopoyéticas son de origen del donante), lo cual comúnmente induce GVHD. Este mecanismo de tolerancia central podría explicar porqué en nuestros experimentos, algunos ratones fueron tolerantes a los injertos alogénicos de piel sin presentar niveles detectables de Tregs de origen del donante inducidos *in vivo*.

Cuando se evaluó la respuesta celular inmune mediada por la producción de IFN- $\gamma$ , se observó una producción reducida de IFN- $\gamma$  de los receptores tratados con Tregs donante-específicos en respuesta al estímulo alogénico, similar a los niveles observados en el control singénico. Esta inhibición de la producción de IFN- $\gamma$  es independiente del nivel de quimerismo, dado que 6 de los 11 ratones ensayados no eran quiméricos cuando se analizó la secreción de IFN- $\gamma$  en respuesta al estímulo alogénico. Los principales tipos celulares productores de IFN- $\gamma$ , una vez que se desarrolla la inmunidad antígeno-específica son los linfocitos Th1 y los linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> (CTL CD8<sup>+</sup>) (Schoenborn & Wilson, 2007). En el ensayo, la estimulación alogénica de los esplenocitos de los receptores que no fueron tratados con Tregs gatilla una alta producción de IFN- $\gamma$ , mientras que el uso de Tregs indujo una disminución significativa en el número de células que secretan IFN- $\gamma$ , por lo tanto nuestro protocolo permitió la inhibición de la respuesta de CTL CD8<sup>+</sup> y/o Th1, la cual contribuye al rechazo del aloinjerto (Wood & Goto, 2012).

No se observó producción de IL-4 o IL-17 en respuesta al desafío alogénico de las células de los receptores tratados o no con Tregs, indicando que en la respuesta efectora alogénica no participan los linfocitos Th2 o Th17, pese a que en otros modelos experimentales se ha descrito la participación de estos LT efectores en el rechazo de órganos sólidos como riñón e intestino delgado (Abadja et al., 2012; Hu et al., 2012).

El ensayo ELISPOT fue realizado aproximadamente 130 días después de trasplante de MO. Para este momento, 6 de los 11 ratones tratados con Tregs donante-específicos que se utilizaron en el ensayo, habían perdido el quimerismo mixto. Sin embargo, no gatillaron una respuesta inmune mediada por la producción de IFN- $\gamma$  frente al estímulo alogénico. Esto sugiere de forma indirecta la depleción de los clones CD8+ y/o Th1 aloreactivos, mediante mecanismos de tolerancia central. Ninguno de los ratones se encontraba bajo el efecto de los inmunosupresores (vida media de CTLA-4Ig es 77 horas, y de rapamicina 57-63 horas en ratones (Srinivas et al., 1995), y todos habían reconstituido todas sus poblaciones hematopoyéticas, por lo cual se puede descartar el efecto de la inmunosupresión y la reconstitución de la población de células efectoras como una causa de la inhibición de la respuesta inmune celular mediada por la producción de IFN- $\gamma$ .

Por otra parte, en el punto final de estos experimentos, 2/9 de los ratones tratados con Tregs que perdieron el quimerismo, aceptaron el trasplante de piel alogénica, mientras que 6/20 de los ratones que mantuvieron quimerismo aceptaron el injerto de piel alogénica. Este resultado sugiere que el protocolo utilizado podría haber inducido mecanismos de tolerancia central, a través de la deleción de linfocitos T aloreactivos,

dada la disminución de la respuesta celular alogénica y el aumento de la supervivencia de los injertos de piel en receptores que perdieron el quimerismo. Adicionalmente, podrían estar mediando mecanismos periféricos de tolerancia, dado que se observó la presencia de Tregs de origen del donante en los receptores que mantienen el quimerismo.

En resumen, en este trabajo desarrollamos un protocolo no-mieloablativo que utiliza Tregs donante-específicos para inducir quimerismo mixto, con lo cual logramos aumentar la supervivencia de un injerto de piel del donante, sin la utilización de ningún régimen inmunosupresor adicional. La aplicación de este tipo de tratamiento es factible en humanos, ya que existen protocolos para producir Tregs donante-específicos *in vitro*, mediante la activación de LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> con DC derivadas de sangre y péptidos diseñados a partir de la identificación de epítopes de antígenos de moléculas MHC clase II (Imai et al., 2012; Stone et al., 2012; Walker et al., 2005).

Eventualmente, en el futuro se podrían generar Tregs contra antígenos de moléculas MHC clase II, criopreservarlos y utilizarlos cuando se requiera realizar un trasplante, tal como ocurre con las células troncales de cordón umbilical. El desarrollo de una biblioteca de variantes de péptidos de moléculas MHC clase II, permitirían inducir Tregs con especificidad contra las variantes antigénicas de un donante parcialmente compatible.

## 6. CONCLUSIONES

Los Tregs donante-específicos generados en condición TILRA conservan la expresión de Foxp3 y su capacidad inmunosupresora después del reconocimiento del antígeno *in vivo*, además favorecen la aceptación de injertos alogénicos.

El protocolo de trasplante de MO no citoreductor utilizado, combinado con Tregs donante-específicos indujo una tolerancia de largo plazo a los trasplantes de médula ósea alogénica, generando un estado de quimerismo mixto. Las quimeras presentaron una sobrevida significativamente mayor de injertos de piel alógena sin el uso adicional de drogas inmunosupresoras. El tratamiento con Tregs donante-específicos permitió controlar la respuesta inmune celular mediada por LT citotóxicos CD8+ y/o Th1 que se produce en el contexto de los trasplantes.

El protocolo de terapia celular con Tregs donante-específicos establecido en este trabajo, constituye una estrategia que puede proyectarse para ser usada en la clínica en humanos.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Abadja, F., Sarraj, B., & Ansari, J. (2012). Significance of T helper 17 immunity in transplantation. *Current opinion in organ transplantation*, 17(1), 8–14. doi:10.1097/MOT.0b013e32834ef4e4. Significance
- Adams, A. B., Durham, M. M., Kean, L., Shirasugi, N., Ha, J., Williams, M. A., ... Larsen, C. P. (2001). Costimulation Blockade, Busulfan, and Bone Marrow Promote Titratable Macrochimerism, Induce Transplantation Tolerance, and Correct Genetic Hemoglobinopathies with Minimal Myelosuppression. *J Immunol*, 167(2), 1103–1111.
- Anderson, D., Billingham, R. E., Lampkin, G. H., & Medawar, P. B. (1951). The use of skin grafting to distinguish between Monozygotic and dizygotic twins in cattle. *Heredity*, (5), 379–397. doi:10.1038/hdy.1951.38
- Bigenzahn, S., Blaha, P., Koporc, Z., Pree, I., Selzer, E., Bergmeister, H., ... Wekerle, T. (2005). The role of non-deletional tolerance mechanisms in a murine model of mixed chimerism with costimulation blockade. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 5(6), 1237–47. doi:10.1111/j.1600-6143.2005.00862.x
- Bilate, A. M., & Lafaille, J. J. (2012). Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. *Annual review of immunology*, 30, 733–58. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075043
- Billingham, R. E., Lampkin, G. H., Medawar, P. B., & Williams, H. L. (1952). Tolerance to homografts, twin diagnosis, AND THE FREEMARTIN CONDITION IN CATTLE. *Heredity*, (6), 201–212. doi:doi:10.1038/hdy.1952.20
- Billingham, R. E., Brent, L., Medawar, P. B. (1953). Actively acquired tolerance of foreign cells.pdf. *Nature*, 172, 603–606.
- Blaha, P., Bigenzahn, S., Koporc, Z., Schmid, M., Langer, F., Selzer, E., ... Wekerle, T. (2003). The influence of immunosuppressive drugs on tolerance induction through bone marrow transplantation with costimulation blockade. *Blood*, 101(7), 2886–93. doi:10.1182/blood-2002-10-3014
- Blazar, B. R., Murphy, W. J., & Abedi, M. (2012). Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nature reviews. Immunology*, 12(6), 443–58. doi:10.1038/nri3212
- Brett Charlton, Hugh Auchincloss, C. G. F. (1994). MECHANISMS OF, 707–734.
- Brunstein, C. G., Fuchs, E. J., Carter, S. L., Karanes, C., Costa, L. J., Wu, J., ... O'Donnell, P. V. (2011). Alternative donor transplantation after reduced intensity conditioning: results of parallel phase 2 trials using partially HLA-mismatched related bone marrow or unrelated double umbilical cord blood grafts Alternative donor transplantation after reduced. *Blood*, 118(2), 282–288. doi:10.1182/blood-2011-03-344853



- Cobbold, S. P., Martin, G., Qin, S., & Waldmann, H. (1986). Monoclonal antibodies to promote marrow engraftment and tissue graft tolerance. *Nature*, *323*, 164–166.
- Deeg, H. J., & Storb, R. (1984). Graft-versus-host disease: pathophysiological and clinical aspects. *Annual review of medicine*, *35*, 11–24. doi:10.1146/annurev.me.35.020184.000303
- Domenig, C., Sanchez-fueyo, A., Kurtz, J., Alexopoulos, S. P., Mariat, C., Sykes, M., ... Zheng, X. X. (2005). Roles of Deletion and Regulation in Creating Mixed Chimerism and Allograft Tolerance Using a Nonlymphoablative Irradiation-Free Protocol. *The Journal of Immunology*, *175*(1), 51–60.
- Ford, M. L., & Larsen, C. P. (2009). Translating costimulation blockade to the clinic: lessons learned from three pathways. *Immunological reviews*, *229*(1), 294–306. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00776.x
- Godfrey, W. R., Ge, Y. G., Spoden, D. J., Levine, B. L., June, C. H., Blazar, B. R., & Porter, S. B. (2004). In vitro-expanded human CD4(+)CD25(+) T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures. *Blood*, *104*(2), 453–61. doi:10.1182/blood-2004-01-0151
- Golshayan, D., Jiang, S., Tsang, J., Garin, M. I., Mottet, C., & Lechler, R. I. (2007). In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. *Blood*, *109*(2), 827–35. doi:10.1182/blood-2006-05-025460
- Hadeiba, H., Lahl, K., Edalati, A., Oderup, C., Habtezion, A., Pachynski, R., ... Butcher, E. C. (2012). Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance. *Immunity*, *36*(3), 438–50. doi:10.1016/j.immuni.2012.01.017
- Haribhai, D., Williams, J. B., Jia, S., Nickerson, D., Schmitt, E. G., Edwards, B., ... Williams, C. B. (2011). A Requisite Role for Induced Regulatory T Cells in Tolerance Based on Expanding Antigen Receptor Diversity. *Immunity*, *35*(1), 109–122. doi:10.1016/j.immuni.2011.03.029
- Hester, J., Schiopu, a, Nadig, S. N., & Wood, K. J. (2012). Low-dose rapamycin treatment increases the ability of human regulatory T cells to inhibit transplant arteriosclerosis in vivo. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, *12*(8), 2008–16. doi:10.1111/j.1600-6143.2012.04065.x
- Hoffmann, P., Ermann, J., Edinger, M., Fathman, C. G., & Strober, S. (2002). Donor-type CD4+CD25+ Regulatory T Cells Suppress Lethal Acute Graft-Versus-Host Disease after Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *Journal of Experimental Medicine*, *196*(3), 389–399. doi:10.1084/jem.20020399
- Hogquist, K. a, Baldwin, T. a, & Jameson, S. C. (2005). Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nature reviews. Immunology*, *5*(10), 772–82. doi:10.1038/nri1707
- Horner, B. M., Randolph, M. a, Huang, C. a, & Butler, P. E. M. (2008). Skin tolerance: in search of the Holy Grail. *Transplant international*, *21*(2), 101–12. doi:10.1111/j.1432-2277.2007.00559.x
- Hu, A., Li, Q., Shi, H., Tai, Q., Wu, L., Xiong, J., ... He, X. (2012). Donor-derived bone marrow transfusion produces mixed chimerism and promotes a Th2 shift in Th1/Th2 balance in rat heterotopic small bowel transplantation. *Digestive and liver disease: official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, *44*(12), 988–994. doi:10.1016/j.dld.2012.08.002

- Ildstad, S. T., & Sachs, D. H. (1984). Reconstitution with syngeneic plus allogeneic or xenogeneic bone marrow leads to specific acceptance of allografts or xenografts. *Nature*, *307*, 168–170.
- Imai, A., Sugita, S., Kawazoe, Y., Horie, S., Yamada, Y., Keino, H., ... Mochizuki, M. (2012). Immunosuppressive properties of regulatory T cells generated by incubation of peripheral blood mononuclear cells with supernatants of human RPE cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, *53*(11), 7299–309. doi:10.1167/iovs.12-10182
- Joffre, O., Gorsse, N., Romagnoli, P., Hudrisier, D., & Meerwijk, J. P. M. Van. (2004). Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4+ CD25+ T lymphocytes. *Blood*, *103*(11), 4216–4221. doi:10.1182/blood-2004-01-0005.Supported
- Joffre, O., Gorsse, N., Romagnoli, P., Hudrisier, D., & van Meerwijk, J. P. M. (2004). Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4+CD25+ T lymphocytes. *Blood*, *103*(11), 4216–21. doi:10.1182/blood-2004-01-0005
- Joffre, O., Santolaria, T., Calise, D., Al Saati, T., Hudrisier, D., Romagnoli, P., & van Meerwijk, J. P. M. (2008). Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *Nature medicine*, *14*(1), 88–92. doi:10.1038/nm1688
- Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F., & Rudensky, A. Y. (2012). Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annual review of immunology*, *30*, 531–64. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623
- Lee, M., Moore, D. J., Jarrett, B. P., Lian, M. M., Deng, S., Huang, X., ... Markmann, J. F. (2004). Promotion of Allograft Survival by CD4 + CD25 + Regulatory T Cells: Evidence for In Vivo Inhibition of Effector Cell Proliferation. *Journal of immunology*, *172*(11), 6539–6544.
- Li, H. W., & Sykes, M. (2012). Emerging concepts in haematopoietic cell transplantation. *Nature reviews. Immunology*, *12*(6), 403–16. doi:10.1038/nri3226
- Li, X. C., & Turka, L. a. (2010). An update on regulatory T cells in transplant tolerance and rejection. *Nature reviews. Nephrology*, *6*(10), 577–83. doi:10.1038/nrneph.2010.101
- Lin, J.-Y., Tsai, F.-C., Wallace, C. G., Huang, W.-C., Wei, F.-C., & Liao, S.-K. (2012). Optimizing chimerism level through bone marrow transplantation and irradiation to induce long-term tolerance to composite tissue allotransplantation. *The Journal of surgical research*, *178*(1), 487–93. doi:10.1016/j.jss.2012.02.064
- Moore, C., Sauma, D., Morales, J., Bono, M. R., Roseblatt, M., & Fierro, J. a. (2009). Transforming growth factor-beta and all-trans retinoic acid generate ex vivo transgenic regulatory T cells with intestinal homing receptors. *Transplantation proceedings*, *41*(6), 2670–2. doi:10.1016/j.transproceed.2009.06.130
- Moore, C., Sauma, D., Reyes, P. a, Morales, J., Roseblatt, M., Bono, M. R., & Fierro, J. a. (2010). Dendritic cells and B cells cooperate in the generation of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) allogeneic T cells. *Transplantation proceedings*, *42*(1), 371–5. doi:10.1016/j.transproceed.2009.12.044
- Nemazee, D. (2006). Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nature reviews. Immunology*, *6*(10), 728–40. doi:10.1038/nri1939

- Nishimura, E., Sakihama, T., Setoguchi, R., Tanaka, K., & Sakaguchi, S. (2004). Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *International immunology*, 16(8), 1189–201. doi:10.1093/intimm/dxh122
- Ogawa, H., Ikegame, K., Yoshihara, S., Kawakami, M., Fujioka, T., Masuda, T., ... Kawase, I. (2006). Unmanipulated HLA 2–3 Antigen-Mismatched (Haploidentical) Stem Cell Transplantation Using Nonmyeloablative Conditioning Hiroyasu. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 1073–1084. doi:10.1016/j.bbmt.2006.06.007
- Owen, R. D. (1945, October 19). Immunogenetic Consequences of Vascular Anastomoses Between Bovine Twins. *Science (New York, N.Y.)*. doi:10.1126/science.102.2651.400
- Owen, R. D. (1959). Genetic Aspects of Tissue Transplantation and Tolerance. *American journal of human genetics*, 11(2 Pt 2), 366–83. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1932149&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Pilat, N, Baranyi, U., Klaus, C., Jaeckel, E., Mpofo, N., Wrba, F., ... Wekerle, T. (2010). Treg-therapy allows mixed chimerism and transplantation tolerance without cytoreductive conditioning. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 10(4), 751–62. doi:10.1111/j.1600-6143.2010.03018.x
- Pilat, Nina, Klaus, C., Gattringer, M., Jaeckel, E., Wrba, F., Golshayan, D., ... Wekerle, T. (2011). Therapeutic efficacy of polyclonal tregs does not require rapamycin in a low-dose irradiation bone marrow transplantation model. *Transplantation*, 92(3), 280–8. doi:10.1097/TP.0b013e3182241133
- Pilat, Nina, & Wekerle, T. (2010). Transplantation tolerance through mixed chimerism. *Nature reviews. Nephrology*, 6(10), 594–605. doi:10.1038/nrneph.2010.110
- Pree, I., Bigenzahn, S., Fuchs, D., Koporc, Z., Nierlich, P., Winkler, C., ... Wekerle, T. (2007). CTLA4Ig PROMOTES THE INDUCTION OF HEMATOPOIETIC CHIMERISM AND TOLERANCE INDEPENDENTLY OF INDOLEAMINE-2,3-DIOXYGENASE (IDO). *Transplantation*, 83(5), 663–667. doi:10.1097/01.tp.0000255594.23445.29.CTLA4Ig
- Raimondi, G., Sumpter, T. L., Matta, B. M., Pillai, M., Corbitt, N., Vodovotz, Y., ... Thomson, A. W. (2010). Mammalian Target of Rapamycin Inhibition and Alloantigen-Specific Regulatory T Cells Synergize To Promote Long-Term Graft Survival in Immunocompetent Recipients. *J Immunol*, 184(2), 624–636. doi:10.4049/jimmunol.0900936
- Robles, A., & Monroy, M. (2011). Clinical Pharmacokinetics of Triple Immunosuppression Scheme in Kidney Transplant ( Tacrolimus , Mycophenolate Mofetil and Corticosteroids), Understanding the Complexities of Kidney Transplantation, Prof. Jorge Ortiz. *In Tech*. doi:10.5772/17632
- P. Ruiz\*, P Maldonado\*, Y. Hidalgo, C.Moore, D. Sauma, M. Roseblatt and MR. Bono. Alloantigen-specific regulatory T cells allow the generation of mixed chimerism and transplant tolerance. Unpublished manuscript.
- Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual review of immunology*, 22, 531–62. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141122

- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M., & Hafler, D. a. (2010). FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature reviews. Immunology*, 10(7), 490–500. doi:10.1038/nri2785
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., & Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 133(5), 775–87. doi:10.1016/j.cell.2008.05.009
- Sayegh, M. H., & Turka, L. A. (1998). The role of T cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *The New England journal of medicine*, 338(25), 1813–1821.
- Schoenborn, J. R., & Wilson, C. B. (2007). Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Advances in immunology*, 96(07), 41–101. doi:10.1016/S0065-2776(07)96002-2
- Sela, U., Olds, P., Park, A., Schlesinger, S. J., & Steinman, R. M. (2011). Dendritic cells induce antigen-specific regulatory T cells that prevent graft versus host disease and persist in mice. *The Journal of experimental medicine*, 208(12), 2489–96. doi:10.1084/jem.20110466
- Shevach, E. M., Dipaolo, R. A., Andersson, J., Zhao, D.-M., Stephens, G. L., & Thornton, A. M. (2006). The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Immunological reviews*, 212, 60–73.
- Sidiropoulos, P., & Boumpas, D. (2004). Lessons learned from anti-CD40L treatment in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*, 13(5), 391–397. doi:10.1191/0961203304lu1032oa
- Srinivas, N. R., Shyu, W. C., Greene, D. S., Barbhaiya, R. H., Weiner, R. S., & Tay, L. K. (1995). Pharmacokinetics of CTLA4Ig (BMS-188667), a novel immunosuppressive agent, following intravenous and subcutaneous administration to mice. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 84(12), 1488–1489.
- Stone, B., Rieck, M., Rawlings, C. a, Kas, A., Shendure, J., Jones, H., & Buckner, J. H. (2012). Identification of novel HLA class II target epitopes for generation of donor-specific T regulatory cells. *Clinical immunology*, 145(2), 153–60. doi:10.1016/j.clim.2012.09.003
- Su, Y., Huang, X., Wang, S., Min, W.-P., Yin, Z., Jevnikar, A. M., & Zhang, Z.-X. (2012). Double negative Treg cells promote nonmyeloablative bone marrow chimerism by inducing T-cell clonal deletion and suppressing NK cell function. *European journal of immunology*, 42(5), 1216–25. doi:10.1002/eji.201141808
- Sykes, M. (2007). Immune tolerance: mechanisms and application in clinical transplantation. *Journal of internal medicine*, 262(3), 288–310. doi:10.1111/j.1365-2796.2007.01855.x
- Sykes, Megan, Szot, G., Swenson, K., & Pearson, D. (1997). Induction of high levels of allogeneic hematopoietic reconstitution and donor-specific tolerance without myelosuppressive conditioning. *Nature medicine*, 3(7), 783–787.
- Taylor, P A, Lees, C. J., & Blazar, B. R. (2002). The infusion of ex vivo activated and expanded CD4+CD25+ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood*, 99(10), 3493–3499. doi:10.1182/blood.V99.10.3493
- Taylor, P. A., Lees, C. J., Waldmann, H., Noelle, R. J., & Blazar, B. R. (2001). Requirements for the promotion of allogeneic engraftment by anti-CD154 (anti-CD40L) monoclonal antibody under nonmyeloablative conditions. *Blood*, 98(2), 467–474. doi:10.1182/blood.V98.2.467

- Trani, J., Moore, D. J., Jarrett, B. P., Joseph, W., Lee, M. K., Singer, A., ... Markmann, J. W. (2013). CD25 + Immunoregulatory CD4 T Cells Mediate Acquired Central Transplantation Tolerance.
- Umemura, a, Morita, H., Li, X. C., Tahan, S., Monaco, a P., & Maki, T. (2004). Dissociation of hemopoietic chimerism and allograft tolerance after allogeneic bone marrow transplantation. *Journal of immunology*, 167(6), 3043–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11544287>
- Vriesendorp, H. M. (2003). Aims of conditioning, 31, 844–854.
- Walker, M. R., Carson, B. D., Nepom, G. T., Ziegler, S. F., & Buckner, J. H. (2005). regulatory T cells from human CD4+ CD25+ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(11), 4103–4108.
- Wekerle, B. T., Sayegh, M. H., Hill, J., Zhao, Y., Chandraker, A., Swenson, K. G., ... Sykes, M. (1998). Extrathymic T Cell Deletion and Allogeneic Stem Cell Engraftment Induced with Costimulatory Blockade Is Followed by Central T Cell Tolerance. *Journal of Experimental Medicine*, 187(12), 2037–2044.
- Wekerle, T, Sayegh, M. H., Ito, H., Hill, J., Chandraker, A., Pearson, D. a, ... Sykes, M. (1999). Anti-CD154 or CTLA4Ig obviates the need for thymic irradiation in a non-myeloablative conditioning regimen for the induction of mixed hematopoietic chimerism and tolerance. *Transplantation*, 68(9), 1348–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10573075>
- Wekerle, Thomas, Blaha, P., Langer, F., Schmid, M., & Muehlbacher, F. (2002). Tolerance through bone marrow transplantation with costimulation blockade. *Transplant immunology*, 9(2-4), 125–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12433677>
- Wekerle, Thomas, Kurtz, J., Ito, H., Ronquillo, J., Dong, V., Zhao, G., ... Sykes, M. (2000). Allogeneic bone marrow transplantation with co-stimulatory blockade induces macrochimerism and tolerance without cytoreductive host treatment. *Nature medicine*, 6(4), 464–469.
- Wekerle, Thomas, & Sykes, M. (2001). MIXED CHIMERISM AND TRANSPLANTATION TOLERANCE. *Annual review of medicine*, 52, 353–370.
- Wells, a D., Li, X. C., Li, Y., Walsh, M. C., Zheng, X. X., Wu, Z., ... Turka, L. a. (1999). Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance. *Nature medicine*, 5(11), 1303–7. doi:10.1038/15260
- Wood, K. J., Bushell, A., & Hester, J. (2012). Regulatory immune cells in transplantation. *Nature reviews Immunology*, 12(6), 417–30. doi:10.1038/nri3227
- Wood, K. J., & Goto, R. (2012). Mechanisms of rejection: current perspectives. *Transplantation*, 93(1), 1–10. doi:10.1097/TP.0b013e31823cab44
- Wood, K. J., Sakaguchi, S., & Radcliffe, J. (2003). REGULATORY T CELLS IN TRANSPLANTATION TOLERANCE, 3(March). doi:10.1038/nri1029
- Wu, T., Zhang, L., Xu, K., Sun, C., Lei, T., Peng, J., ... Zhao, Y. (2012). Immunosuppressive drugs on inducing Ag-specific CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Treg cells during immune response in vivo. *Transplant immunology*, 27(1), 30–8. doi:10.1016/j.trim.2012.05.001

- Wu, Y., Borde, M., Heissmeyer, V., Feuerer, M., Lapan, A. D., Stroud, J. C., ... Rao, A. (2006). FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*, 126(2), 375–87. doi:10.1016/j.cell.2006.05.042
- Xia, G., Shah, M., & Luo, X. (2009). Prevention of allograft rejection by amplification of Foxp3(+)CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, 153(2), 60–70. doi:10.1016/j.trsl.2008.12.001
- Xiao, S., Jin, H., Korn, T., Liu, S. M., Oukka, M., Lim, B., & Kuchroo, V. K. (2008). Retinoic Acid Increases Foxp3+ Regulatory T Cells and Inhibits Development of Th17 Cells by Enhancing TGF- $\beta$ -Driven Smad3 Signaling and Inhibiting IL-6 and IL-23 Receptor Expression. *The Journal of Immunology*, 181(4), 2277–2284.
- Xu, H., Chilton, P. M., Huang, Y., Schanic, C. L., & Ildstad, S. T. (2004). Production of donor T cells is critical for induction of donor-specific tolerance and maintenance of chimerism. *Journal of immunology*, 172(3), 1463–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14734723>
- Xu, L., Kitani, A., Fuss, I., Strober, W., & Alerts, E. (2007). Cutting Edge : Regulatory T Cells Induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-b. *J Immunol*, 178(11), 6725–6729.
- Yang, X. O., Nurieva, R., Martinez, G. J., Kang, H. S., Chung, Y., Pappu, B. P., ... Dong, C. (2008). Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity*, 29(1), 44–56. doi:10.1016/j.immuni.2008.05.007.Molecular
- Zhou, L., Chong, M. M. W., & Littman, D. R. (2009). Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity*, 30(5), 646–55. doi:10.1016/j.immuni.2009.05.001
- Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S. L., Jeker, L. T., Penaranda, C., Martínez-Llordella, M., Ashby, M., ... Bluestone, J. a. (2009). Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nature Immunology*, 10(9), 1000–1007. doi:10.1038/ni.1774