



MÁSTER
UNIVERSITARIO EN
INVESTIGACIÓN
Y MEDICINA
CLÍNICA



FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Análisis prospectivo de las células T
reguladoras implicadas en la tolerancia
operacional en pacientes con trasplante
hepático.**

Alumno (Apellidos, nombre): **de Béjar Almira, África**

Tutor (Apellidos, nombre): **Francés, Rubén**

Curso: 2015-2016



MÁSTER
UNIVERSITARIO EN
INVESTIGACIÓN
Y MEDICINA
CLÍNICA



FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

TRABAJO FIN DE MÁSTER



SOLICITUD DE EVALUACIÓN DE TRABAJO FIN DE MÁSTER

DATOS PERSONALES DEL ESTUDIANTE

Nombre y apellidos: África de Béjar Almira
Titulación: Licenciada en Biología
DNI: 48462425E
Domicilio: Calle Ruiz Capdepón nº2 4ª
CP y población: 03300, Orihuela

Correo electrónico: africa_debejaralmira@yahoo.es
Teléfono: 635135885

SOLICITA:

La evaluación y defensa del Trabajo Fin de Máster titulado: **“Análisis prospectivo de las células T reguladoras implicadas en la tolerancia operacional en pacientes con trasplante hepático”**

EN LA CONVOCATORIA DE:

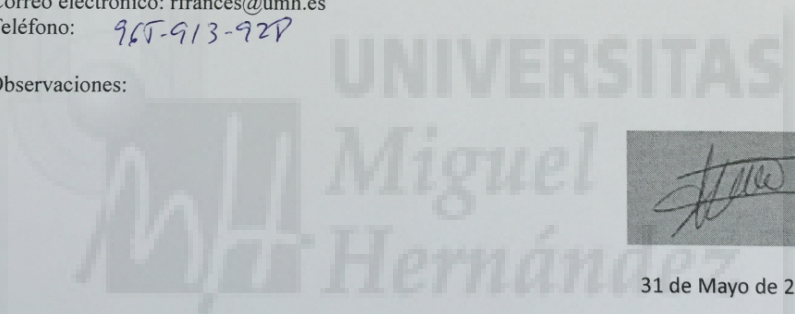
JULIO

SEPTIEMBRE

DATOS PERSONALES DEL TUTOR/TUTORES

Nombre y apellidos: Rubén Francés
Correo electrónico: rfrances@umh.es
Teléfono: 965-913-928

Observaciones:



31 de Mayo de 2016

Fecha y firma de autorización
Tutor/Tutores

1.6.16

Fecha y firma del
estudiante

SR. DIRECTOR DEL MÁSTER UNIVERSITARIO
EN INVESTIGACIÓN EN MEDICINA CLÍNICA



TITULO: Análisis prospectivo de las células T reguladoras implicadas en la tolerancia operacional en pacientes con trasplante hepático.

RESUMEN:

En este trabajo nos proponemos un estudio prospectivo de retirada de los fármacos inmunosupresores en pacientes con trasplante hepático de larga evolución, siguiendo un control continuo de la función hepática. El objetivo principal es determinar de forma prospectiva, parámetros inmunológicos y genéticos que nos permitan diferenciar entre los pacientes que alcanzan la "tolerancia operacional" vs pacientes que sufren un episodio de rechazo (no tolerantes). Durante este proceso pretendemos estudiar de forma protocolizada y exhaustiva, mediante la toma de muestras periódicas, múltiples parámetros a nivel inmunológico y genético que incluyan: inmunofenotipado en sangre periférica de distintas subpoblaciones celulares incluyendo células T reguladoras, NK, B, dendríticas y otros marcadores específicos; Determinación del nivel de citoquinas en suero; Determinación del nivel de metilación del gen FOXP3 en sangre periférica y tejido; Determinación de la concentración de ferritina, hepcidina-25, ATP y adenosina en suero. Con estos estudios se pretende comprobar el valor pronóstico de uno o varios de estos parámetros combinados, además de intentar dilucidar la secuencia fisiológica de un proceso de tolerancia operacional en pacientes con trasplante hepático.

PALABRAS CLAVE: células T reguladoras, inmunosupresión, metilación, tolerancia, trasplante hepático.

TITLE: Prospective analysis of immunological factors and genetic expression implicated in operational tolerance in liver transplant patients.

SUMMARY:

In this work we propose a prospective study of withdrawal in liver transplant patients with long evolution, using a continuous monitoring of the parameters of liver function. The aim of this project is to identify patients who meet the "operational tolerance" vs patients who suffer an episode of rejection (non-tolerant). During this process we intend to study

in a thorough manner, by taking periodic samples, several immunological and genetic parameters including: immunophenotyping of different cellular subpopulations of peripheral blood as Treg, NK, B, dendritic cells and other specific markers; quantification of the level of serum cytokines; determination of the methylation status of FOXP3 in peripheral blood and tissue; determination of the concentration of serum ferritin, hepcidin-25, ATP and adenosine. The aim of this project is to detect the prognostic value of one or several parameters, as well as try to elucidate the physiological sequence of the operational tolerance in liver transplant patients.

KEYWORDS: inmunosupresion, liver transplantation, metilation, regulatory T cells, tolerance.

INDICE:

1. Introducción.

- a. Tolerancia operacional en el trasplante hepático.
- b. Inmunología del proceso de tolerancia operacional.
 - b.i. Papel de las distintas poblaciones celulares.
 - b.ii. Papel de las citoquinas.
 - b.iii. Metabolismo del ATP extracelular y señalización purinérgica.
 - b.iv. Perfil genético de los pacientes tolerantes.

2. Hipótesis.

3. Objetivos.

4. Metodología.

- a. Sujetos de estudio sometidos a retirada de inmunosupresión de forma prospectiva (criterios de inclusión y exclusión).

- b. **Protocolo de retirada de inmunosupresión.**
 - c. **Toma de muestras.**
 - d. **División de las diferentes muestras en estadios.**
 - e. **Estudios analíticos rutinarios.**
 - f. **Estudio de la evolución de subpoblaciones de células mononucleares en sangre periférica a lo largo de la retirada de la inmunosupresión.**
 - g. **Estudios epigenéticos.**
 - h. **Estudio de la evolución de citoquinas en sangre periférica a lo largo de la retirada de la inmunosupresión.**
 - i. **Análisis de la concentración sérica de ferritina y Hepsidina-25.**
 - j. **Análisis de la concentración sérica de ATP y Adenosina.**
 - k. **Análisis estadístico.**
5. **Plan de trabajo.**
 6. **Experiencia del equipo investigador sobre el tema.**
 7. **Medios disponibles para la realización del proyecto.**
 8. **Justificación detallada de las partidas presupuestarias solicitadas.**
 9. **Presupuesto.**
 10. **Resultados.**
 11. **Bibliografía.**

1. INTRODUCCIÓN.

Los avances en el tratamiento inmunosupresor han tenido un gran impacto en la evolución y en el éxito de los trasplantes de órganos y en particular del trasplante hepático. Con la introducción de nuevos fármacos inmunosupresores, la incidencia de rechazo agudo ha disminuido de forma considerable, y la supervivencia de los pacientes con trasplante hepático es del 83% al año y del 70% a los 5 años [1]. Sin embargo, la toxicidad asociada con el uso de estos fármacos es importante, condicionando la aparición de hipertensión arterial, hiperlipemia, diabetes, insuficiencia renal y tumores *de novo* en los pacientes trasplantados [2,3]. Por todo ello, y para mejorar la eficacia y la especificidad de los tratamientos inmunosupresores, es imprescindible profundizar en el conocimiento de los mecanismos de la respuesta allogénica primaria contra antígenos extraños y en los mecanismos de tolerancia específica de antígeno, con el fin de evitar o disminuir al máximo posible el uso de fármacos inmunosupresores.

a. Tolerancia Operacional en el trasplante hepático.

Es un hecho conocido, que el trasplante hepático entre especies animales como el cerdo y entre ciertas combinaciones de ratas y ratones, puede realizarse sin inmunosupresión [4– 6]. Esta observación en animales y la posibilidad de retirar completamente los fármacos inmunosupresores en pacientes seleccionados con trasplante hepático, nos permite afirmar que el hígado es un órgano inmunológicamente privilegiado [7,8], que puede tolerarse tras el trasplante con menor inmunosupresión y en ocasiones es posible retirar completamente los fármacos inmunosupresores (tolerancia

operacional) [9]. Además, recientemente se ha demostrado que en los pacientes con tolerancia operacional mejora la función renal y diversos parámetros de riesgo cardiovascular [10].

Datos experimentales apoyarían la idea de poder inducir tolerancia en humanos sometidos a trasplante de órganos. Aunque la tolerancia sería el objetivo ideal, la heterogeneidad de combinaciones posibles entre donante y receptor, el estado inmune del receptor, la enfermedad de base del paciente trasplantado, y las consecuencias imprevisibles de las infecciones hacen que una tolerancia estable sea extremadamente difícil en todos los pacientes [11]. Aún así, la importancia de este hecho ha llevado a la creación de un consorcio europeo (RISET) y otro en USA (ITN) para intentar trasladar los estudios sobre tolerancia a la clínica.

b. Inmunología del proceso de tolerancia operacional.

i. Papel de las distintas poblaciones celulares.

La tolerancia a antígenos propios, al igual que la tolerancia a los aloantígenos es una función del sistema inmune. Los mecanismos implicados en la tolerancia a los órganos trasplantados son complejos y no totalmente conocidos, aunque el papel de las células T reguladoras (Treg) en este proceso parece cada vez más decisivo. A finales de los 90, Sakaguchi y colaboradores fueron capaces de demostrar que una población celular minoritaria comprendida entre el 5 y el 10 % de los linfocitos periféricos, que se forman en el timo y coexpresan CD4 y CD25, juegan un papel crucial en la prevención de enfermedades autoinmunes organoespecíficas, determinando la respuesta inmune a autoantígenos y aloantígenos y pudiendo estar envueltas en la prevención del rechazo e inducción de la tolerancia al trasplante [12]. Estas células ejercen una supresión de la activación de las células Th y T citotóxicas, bien por contacto o por secreción de citoquinas tipo TGF- β 1, IL-2 e IL-10 [13]. Se ha definido fenotípicamente a esta población de Treg implicadas en la inducción de tolerancia como CD4+CD25^{high}+FoxP3+, aunque actualmente se pueden identificar más sencillamente como CD4+CD25+CD127-. FoxP3 es un factor de transcripción implicado en la generación y mantenimiento del fenotipo Treg y tiene una alta expresión

prácticamente en exclusiva en las células T CD4+CD25+. Interesantemente, hay estudios clínicos recientes donde se observa un aumento de la población de células Treg CD4+CD25^{high} periféricas en pacientes trasplantados de hígado que han alcanzado la tolerancia operacional [14,15]. Sin embargo, estos estudios fueron llevados a cabo de forma retrospectiva donde pacientes que habían alcanzado la tolerancia operacional hacía más de dos años eran comparados con pacientes inmunosuprimidos. En este sentido, nuestro grupo desde el año 2008 dio un paso más y estudió de forma prospectiva un proceso de retirada de la IS en pacientes con trasplante hepático, midiendo varios parámetros inmunológicos a lo largo de todo el proceso de retirada [16]. En este estudio se observó un incremento de la población CD4+CD25^{high} cuando la IS fue retirada completamente y un incremento superior a 3 veces en la expresión relativa de mRNA de FoxP3 en células mononucleares de sangre periférica antes de la retirada completa de la IS. Algunos grupos, han alcanzado resultados similares a los nuestros pero analizando muestras de biopsias de pacientes trasplantados de riñón o hígado tolerantes vs inmunosuprimidos, observando más células FoxP3⁺ en el área portal en el grupo tolerante [17,18]. Actualmente, las células Treg se dividen en dos poblaciones; naturales (nTreg) e inducidas (iTreg). La primeras surgen en el timo y las iTreg derivan de células T CD4+CD25-FoxP3⁻ en sangre periférica. Incluso estas poblaciones se pueden subdividir utilizando otros marcadores como ICOS, que define una población de nTreg productoras de IL-10 y TGF-beta (ICOS⁺) y otras solamente de TGF-beta (ICOS⁻) [19]. Por el contrario, es difícil hacer una distinción entre las células nTreg y las iTreg, como tampoco se conoce con exactitud cuál de las dos poblaciones aporta más a los procesos de supresión y tolerancia [20]. Por un lado, mientras que las nTreg pueden ser inducidas a células Th17 en presencia de IL6, las iTreg parecen tener inhibida la expresión del receptor de la IL6 (CD126), obteniendo cierto grado de resistencia a la conversión a células de tipo pro-inflamatorio [21]. Igualmente, un 70% de Treg periféricas expresan Helios [22], que serían nTreg, ya que Treg inducidas in vitro no expresan este marcador. Por otro lado, una de las principales diferencias encontradas

hasta el momento, es que las iTregs son particularmente inestables y tienden a perder más fácilmente la expresión de FoxP3 que las nTreg, lo cual probablemente está relacionado con las diferencias epigenéticas en el gen FOXP3 en ambas subpoblaciones, de modo que se ha demostrado que ciertas regiones no codificantes del gen FOXP3 (Región desmetilada específica de Treg - TSDR) en las células nTreg permanecen completamente desmetiladas mientras que en las iTreg tales regiones aparecen metiladas [23,24]. Parece claro que la estabilidad de FoxP3 es muy importante en el fenotipo Treg, ya que se ha demostrado que incluso algunas células nTreg (Ex-Treg) y las iTreg pueden perder la expresión de FoxP3 y adquirir un fenotipo proinflamatorio, por lo que el reconocimiento de una población de células Treg FoxP3 estables podría ser esencial en el complicado entramado de la tolerancia [20– 24].

Sin embargo, no todas las poblaciones de células T descritas como reguladoras son FoxP3+, aunque poco se conoce actualmente sobre su función [20]. Entre estas poblaciones se encuentran las células Tr1 CD4+, inducidas principalmente por IL-27, productoras de gran cantidad de IL10 como única citoquina, con una posible función descrita en autoinmunidad [25]; las células Tr35 CD4+ con gran producción de IL35 (26) y las CD3+CD4-CD8- (células DN T) [27]. Más allá de las células T como reguladoras, hay actualmente trabajos muy recientes sobre la capacidad reguladora de las células B, de modo que igual que las células Treg, la supresión mediada por estas células B reguladoras (Breg) es muy importante en el mantenimiento de la tolerancia [28]. La mayoría de estos estudios se han realizado en modelos animales de enfermedades como autoinmunidad, infección y cáncer [28], pero actualmente se ha publicado un trabajo sobre la importancia de las células B periféricas en tolerancia al trasplante en pacientes trasplantados de riñón [29], encontrando un incremento en el número absoluto de células B principalmente células B activadas, de memoria y tempranas de memoria en los pacientes tolerantes respecto a los que mantenían la inmunosupresión.

Otra población que juega un papel activo en la tolerancia son las células dendríticas (DCs), que a través de varios mecanismos son capaces de

inducir la formación de células T reguladores Tr1, nTregs o iTregs. Parece que ciertas subpoblaciones de DCs tienen un fenotipo tolerogénico y están especializadas en inducir la diferenciación de Tregs. La expresión de la enzima del catabolismo del triptófano IDO en DCs puede jugar un papel crítico en la tolerancia inmune promoviendo la inducción de Tregs [30]. También la señalización de estas DCs a través de CTLA-4 parece aumentar la inducción de iTregs dependiente de TGF-beta [21]. No obstante, estudios llevados a cabo por el grupo del doctor Sanchez-Fueyo en colaboración con nuestro grupo [31], han puesto de manifiesto el comportamiento diferencial de las poblaciones de células NK y $\gamma\delta$ TCR+, o incluso el ratio $V\delta 1/2$ TCR+, entre pacientes con trasplante hepático tolerantes y no tolerantes en un estudio retrospectivo, poniendo de manifiesto que no sólo las células reguladoras forman parte de este amplio entramado inmunológico.

ii. **Papel de las citoquinas**

Dependiendo de las citoquinas presentes en el ambiente de un trasplante cuando se produce la activación por antígeno, las células CD4+ vírgenes pueden adquirir una variedad de fenotipos citopáticos y/o inmunoreguladores [32]. Cuando estas células se activan en presencia de IL-12, pueden llegar a ser células Th1 productoras de IFN- γ . En cambio, en presencia de IL-4 pueden diferenciarse a células Th2, productoras de IL-4 e IL-5. En ausencia de citoquinas proinflamatorias, TGF- β induce la formación de Tregs FoxP3+. En cambio, la presencia de IL-6 o IL-21 junto con TGF- β inhibe el desarrollo de estas Tregs, formándose en este caso células Th17 productoras de IL-17, las cuáles son citopáticas [33]. Recientes estudios han revelado que Tregs y Th17 tienen plasticidad y están interrelacionadas. Así, Tregs pueden diferenciarse a Th17 en presencia de IL-2 e IL-1b, mientras que en presencia de IL-27, las células Th17 pueden producir IL-10 y tener un efecto inmunosupresor [34]. De este modo, se cree que el rechazo o la aceptación de un trasplante estaría determinado por el balance entre células citopáticas Th1-Th17 vs células citoprotectoras Treg, y este balance dependería del nivel de inflamación del microambiente donde la activación de las células T tiene lugar [35].

iii. **Metabolismo del ATP extracelular y señalización purinérgica**

El ATP liberado al espacio extracelular por células necróticas es un indicador de daño celular y el cual a través de receptores purinérgicos (P2X7) de macrófagos y DCs activa el inflammasoma y provoca la liberación de la citoquina proinflamatoria IL-1b [36]. Incluso ATP liberado por linfocitos T activados, señala sobre ellos mismos, jugando un papel esencial en el influjo de calcio mediado por el TCR y la producción de IL-2 [37]. CD39 es la ectoenzima dominante en el sistema inmune que hidroliza ATP a ADP o AMP, y es expresada en el 50% de las Treg humanas [38]. Al hidrolizar el ATP a través de CD39, las Treg CD39+ pueden suprimir la liberación de IL-1b y favorecer la síntesis de metabolitos inmunomoduladores como la adenosina en concierto con la ecto-nucleotidasa CD73, que desfosforila el AMP. Esta adenosina puede señalar a través de receptores purinérgicos P1 de las células T efectoras, como ADORA2A o ADORA3, ejerciendo un efecto inhibitorio de la activación [39]. Los niveles de adenosina en el medio extracelular serían controlados por la adenosina desaminasa (ADA), que degradaría esta adenosina a inosina.

iv. **Perfil genético de los pacientes tolerantes.**

Algunos estudios en pacientes trasplantados, principalmente hepáticos, se han centrado en estudiar el perfil genético de los pacientes tolerantes vs no tolerantes. Ya nuestro grupo en el 2008 [16] estableció la evolución de la expresión de FoxP3 en la retirada de la IS como un posible marcador diferencial entre los dos grupos de pacientes. En este sentido, uno de los estudios más exhaustivos fue llevado a cabo por el grupo del Dr. Sanchez-Fueyo [31], donde se describió de forma retrospectiva, una cohorte de 26 genes que se expresaban de forma diferencial entre ambos grupos, y que tenían una alta capacidad predictiva. Igualmente, este grupo en 2012 [40], describió otro número pequeño de genes, en este caso a nivel intra-injerto, relacionados con la homeostasis del hierro, que también se expresan de forma diferencial. Además se comprobó que los pacientes tolerantes tenían mayores niveles de hepcidina-25 y ferritina en suero que los pacientes no tolerantes.

2. HIPÓTESIS.

El estudio y análisis conjunto de múltiples parámetros inmunológicos descritos hasta ahora en la literatura de forma individualizada y mayoritariamente retrospectiva, en un grupo de pacientes con trasplante hepático estable sometidos a retirada progresiva de la IS, nos permitirá, tras un exhaustivo análisis estadístico, determinar una combinación de marcadores específicos que nos indiquen con la mayor fiabilidad posible que pacientes con trasplante hepático podrían ser tolerantes tras un proceso de retirada progresiva de la IS. Además, el estudio de estos marcadores en varios puntos a lo largo del proceso de retirada de la IS, podrá arrojar algo más de luz sobre que fenómenos son más importantes para la consecución de un estado inmunológicamente favorable a la tolerancia del injerto.

3. OBJETIVOS.

1. Evaluar la posibilidad de retirar completamente los fármacos inmunosupresores en pacientes con trasplante hepático que tengan complicaciones derivadas de la inmunosupresión analizando diversos parámetros inmunológicos implicados en el desarrollo de tolerancia.
2. Conocer la evolución de diferentes parámetros inmunológicos implicados en el proceso de tolerancia durante la retirada progresiva de la IS. Los parámetros a estudiar incluirán: inmunofenotipado en sangre periférica de distintas subpoblaciones celulares incluyendo células T reguladoras, NK, B, dendríticas y otros marcadores específicos; Determinación del nivel de citoquinas en suero; Determinación del nivel de metilación de la zona TSDR del gen FOXP3 en sangre periférica; Determinación de la concentración de ferritina, hepcidina-25, ATP y adenosina en suero.
3. Determinar la precisión diagnóstica de uno o varios de estos biomarcadores de tolerancia en sangre o tejido hepático, juntos o por separado, a la hora de predecir con la mayor precisión posible, el

resultado de la retirada protocolizada de la medicación inmunosupresora.

4. METODOLOGIA.

a. Sujetos de estudio sometidos a retirada de inmunosupresión de forma prospectiva. Se incluirán 50 pacientes con trasplante hepático realizado en el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia. El grupo control estará formado por 16 individuos sanos. Será condición indispensable la firma de consentimiento informado antes de iniciar el protocolo en cada paciente.

Criterios de inclusión.

a. Haber sido trasplantado de hígado hace más de dos años; **b.** Tratamiento con inmunosupresión que incluya ciclosporina o tacrolimus. **c.** Tener una función hepática normal en el último año; **d.** No haber sufrido rechazo agudo en el último año y no tener rechazo crónico; **e.** Presentar algún efecto secundario significativo por la medicación inmunosupresora (hipertensión, creatinina superior a 1.7 mg/dL, diabetes, obesidad mórbida, osteoporosis, hiperlipemia, hirsutismo severo, neurotoxicidad, neoplasia de novo, etc); **f.** Etiología de la enfermedad de base: cirrosis alcohólica con o sin hepatocarcinoma, enfermedades metabólicas, polineuropatía amiloidótica familiar; atresia de vías biliares, hepatitis fulminante no A, no B, no C, cirrosis criptogénica y en general, causas no autoinmunes ni víricas. **g.** Pacientes que ofrezcan garantías suficientes de adhesión al protocolo; **h.** Pacientes que otorguen su consentimiento informado por escrito para participar en el estudio.

Criterios de exclusión.

a. Enfermedad de base de carácter autoinmune (Colangitis esclerosante primaria, cirrosis autoinmune, Cirrosis biliar primaria) o hepatocarcinoma sobre cirrosis de origen vírico o autoinmune; **b.** Pacientes con rechazo crónico, o rechazo agudo en el último año; **c.** Pacientes con retrasplante hepático; **d.** Incapacidad de comprender el consentimiento informado.

b. **Protocolo de retirada de la inmunosupresión.** Se comenzará por la retirada de los fármacos anticalcineurínicos (ciclosporina o tacrolimus), disminuyendo la dosis un 10% cada mes hasta su retirada total en aquellos pacientes que no sufran alteraciones de los parámetros bioquímicos hepáticos. Posteriormente tras un mes de observación se retirarán los corticoides y/o la azatioprina y/o micofenolato mofetil durante un mes en los casos que se estuvieran tomando dichos fármacos. Cuando exista una elevación de transaminasas (U/L) o bilirrubina (mg/dl) por encima de tres veces la normalidad, o de Fosfatasa alcalina (U/L) por encima de 1.5 la normalidad se realizará biopsia hepática (con aguja de Tru-Cut bajo control ecográfico) para comprobar si existe rechazo agudo, en cuyo caso el paciente no reducirá más las dosis de inmunosupresores y se volverá a la dosis de medicación inmunosupresora inicial, administrando bolos de metilprednisolona en los casos que no se normalicen los parámetros bioquímicos de función hepática. En los pacientes que estén tomando ciclosporina, se cambiará ésta por tacrolimus en los casos de no respuesta o cuando el rechazo sea moderado o severo. Cuando existan alteraciones histológicas de difícil interpretación también se suspenderá la retirada de inmunosupresión. En los casos sin rechazo que normalicen los parámetros bioquímicos hepáticos tras un periodo de observación de un mes, se continuará el protocolo de disminución de inmunosupresores.

c.- **Toma de muestras.** Mensualmente y cuando las condiciones clínicas lo exijan, se realizará una extracción sanguínea en diferentes tubos (según las pruebas a realizar) a los pacientes sometidos a estudio para el análisis de las diversas variables. Del mismo modo, se realizarán biopsias hepáticas antes de comenzar el estudio, 2 meses después de terminar el estudio y cuando las indicaciones médicas así lo determinen (ver consentimiento informado), que serán recogidas en formalina al 4% para utilizarlas en análisis histológicos rutinarios, ultracongeladas para estudios de inmunohistoquímica o extracción de DNA, o embebidas en RNAlater (SIGMA-ALDRICH) para una posterior extracción de RNA total.

d.- División de las diferentes muestras en estadios.

Muestra Basal.- Obtenida previamente al comienzo de la retirada de la IS; Muestras PreTolerancia o PreRechazo.- Formarán parte todas las muestras tomadas los meses anteriores a la retirada total y eficaz de la IS o anterior a un episodio de rechazo durante la retirada de la IS, respectivamente; Muestras PostTolerancia o PostRechazo.- Formarán parte todas las muestras tomadas los meses posteriores a haber alcanzado la tolerancia operacional o tras haber sufrido un episodio de rechazo y haberse restablecido el régimen normal de IS, respectivamente, hasta finalizar el periodo de estudio.

e. Estudios analíticos rutinarios.

-Evaluación clínica.

Se analizarán de forma mensual y cuando clínicamente se considere oportuno los siguientes parámetros:

Función hepática: proteínas totales, albúmina, bilirrubina, GOT, GPT, Fosfatas alcalina, GGT, índice de Quick.

Niveles de inmunosupresores: Ciclosporinemia, niveles de tacrolimus.

Parámetros hematológicos básicos: Hemoglobina, hematocrito, plaquetas y leucocitos.

Parámetros metabólicos: ferritina, glucosa, ácido úrico, triglicéridos, colesterol, colesterol-HDL y colesterol-LDL.

Parámetros de función renal: creatinina, urea, filtrado glomerular (MDRD), aclaramiento de creatinina.

f.- Estudio de la evolución de subpoblaciones de células mononucleares en sangre periférica a lo largo de la retirada de la IS.

Las poblaciones leucocitarias en diferentes etapas de desarrollo del proyecto se estudiarán mediante inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos monoclonales adecuados, de sangre completa extraída en tubos con EDTA y posterior análisis en un citómetro de flujo BD FACS Canto. Las poblaciones a definir constarán de:

Linfocitos T CD4 naive: CD3+CD4+CD197+CD45RA+
Linfocitos T CD4 memoria: CD3+CD4+CD197+CD45RA
Linfocitos T CD4 efectores: CD3+CD4+CD197-CD45RA
Células T reguladoras: CD3+CD4+CD25+CD127^{low}/- (Helios/ICOS/CD126/CD39)
Linfocitos T CD8 naive: CD3+CD8+CD27+CD45RA+
Linfocitos T CD8 memoria: CD3+CD8+CD27-CD45RA
Linfocitos T CD8 reguladores: CD3+CD8+CD28-
Linfocitos T doble negativos: CD3+CD4-CD8-
Linfocitos T $\gamma\delta$ TCR: CD3+ $\gamma\delta$ TCR+
Ratio Linfocitos T V δ 1/2 TCR: CD3+V δ 1/V δ 2 TCR+
Células NK: CD3-CD16/56+
Células NKT: CD3+V α 24-J α Q/TCR+
Linfocitos B naive: CD3-CD19+IgD+CD27-CD150+
Linfocitos B memoria: CD3-CD19+IgD-CD27+CD150-
Linfocitos B transición: CD3-CD19+IgM-CD27-CD38+
Linfocitos B activados maduros: CD3-CD19+IgM-CD27+CD38+
Linfocitos B reguladores: CD3-CD19^{high}CD1^{dhigh}CD5+
Células dendríticas plasmocitoides: HLA-DR+Lin-CD11c-CD123+
Células dendríticas mieloides: HLA-DR+Lin-CD11c+CD123-
Células dendríticas inmaduras: HLA-DR^{low}CD1^{ahigh}CD83-CD197+
Ectonucleotidasas/receptor adenosina:
CD39+/CD73+/CD26+/ADORA2A+/ADORA3+ (Linf T/B)

Cuando los marcadores sean de origen intracelular (Helios, ICOS, ADORA2A), tras el marcaje extracelular y posterior lisis de eritrocitos con PharmLyse™ (BD), los leucocitos se permeabilizarán con BD Cytfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution y se teñirán con el anticuerpo indicado siguiendo el protocolo de tinción intracelular recomendado por la casa comercial.

g.- **Estudios epigenéticos.** Análisis del grado de desmetilación de la región TSDR del gen FOXP3 a nivel de sangre periférica y tejido. El DNA genómico

será extraído con el DNAeasy blood and tissue kit (Quiagen) utilizando 100 µl de sangre completa o biopsia de hígado. El DNA extraído será sometido a reacción de bisulfito (EpiTect Bisulfite kit) y el análisis del grado de metilación de la región TSDR del gen FOXP3 se llevará a cabo por pirosecuenciación de este DNA modificado, utilizando los kits específicos para CpG pirosecuenciación de Qiagen, el pirosecuenciador PyroMark Q24 y su software propio de análisis. Los primers para esta técnica se diseñarán utilizando el programa de diseño de primers PyroMark Assay Design Software 2.0 (Qiagen).

h.- Estudio de la evolución de citoquinas en sangre periférica a lo largo de la retirada de la IS. Las citoquinas IFN-g, IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17a, IL-27 y TGF-beta1 serán analizadas por citometría de flujo en un citometro FacsCanto utilizando la técnica multiplex FlowCytomix (eBioscience). Por su parte, IL-35 será analizada mediante ELISA (Cusabio). Para ello se utilizará suero de los pacientes de cada una de las muestras extraídas, que será almacenado en alícuotas a -80°C hasta su uso.

i.- Análisis de la concentración sérica de ferritina y hepcidina-25. La ferritina se medirá en los laboratorios de análisis clínicos del Hospital Virgen de la Arrixaca en los estudios analíticos rutinarios (ver apartado 6). Por su parte, la hepcidina-25 se valorará mediante ensayo de ELISA (Cusabio). Se utilizarán muestras de sueros como en el apartado 10.

j.- Análisis de la concentración sérica de ATP y adenosina. Se obtendrán muestras de sangre en un medio formulado para proteger la lisis de los eritrocitos y las plaquetas siguiendo el protocolo de Gorman et al (Clinical Chem. 53: 318-25. 2007). A partir de estas muestras se obtendrá el plasma que será almacenado a -80°C hasta su utilización. Muestras de plasma sometidas a extracción ácida (Harkness et al. - Clin Chim Acta 143: 91-8. 1984) serán utilizadas para determinar la concentración de ATP y adenosina mediante gases-masa.

k.- **Análisis estadístico.** Inicialmente se realizará análisis descriptivo de todas las variables en estudio, tanto de las condiciones basales de cada una de ellas como de su evolución. Este análisis se realizará para el grupo total de individuos que participen en el estudio y para cada uno de los subgrupos que se formen en función de la aparición de rechazo durante la inmunosupresión. Las variables cuantitativas se describirán mediante la media, mediana, la desviación típica, el intervalo de confianza al 95%, el rango intercuartílico y los valores mínimo y máximo. Las variables cualitativas se presentarán en forma de tabla incluyendo las frecuencias relativas y absolutas, tanto para los subgrupos formados, como para la población global. Posteriormente se realizará un análisis comparativo. Las condiciones de aplicación de los análisis estadísticos se verificarán previamente a los mismos. La normalidad fue contrastada mediante el test de Kolmogorov - Smirnov y la homocedasticidad mediante la prueba de Levene. En caso de incumplimiento de alguna de las condiciones se procederá al análisis mediante pruebas no paramétricas. Este se considera un estudio de evaluación de factores pronósticos del proceso de aparición de rechazo en pacientes trasplantados de hígado a los que se les retira la inmunosupresión farmacológica (variable dependiente). Las variables pronósticas (variables independientes) serán: recuento de subpoblaciones de mononucleares, niveles de citocinas, niveles de expresión génica, variables inmunohistoquímicas y variables epigenéticas. Inicialmente se realizará análisis comparativo de la evolución de las distintas variables en ambos subgrupos. Para ello se efectuará test paramétrico como ANOVA para medidas repetidas con un factor intrasujeto (tiempo) y un factor intersujeto (subgrupo de rechazo) o no paramétricas (Wilcoxon o Friedman) según características propias de las variables en estudio. Las variables cualitativas serán analizadas mediante test de homogeneidad basadas en la distribución χ^2 , cuando los valores esperados lo hagan posible y mediante test exactos de Fisher en caso contrario. Posteriormente se realizará análisis de regresión logística para averiguar el nivel de influencia de cada una de las variables en la aparición de rechazo. La variable

dependiente se define como rechazo del trasplante tras retirada de inmunosupresión SI/NO y se incluirán como variables independientes a aquellas variables que hayan demostrado diferencias basales en sus mediciones o diferencias en su evolución tras análisis comparativo anterior entre los subgrupos a estudio. Este análisis de regresión logística se realizará para dos situaciones distintas en función de los factores pronósticos considerados: medida basal de las variables independientes (antes de retirada de inmunosupresión) o análisis evolutivo de las distintas variables.

En el conjunto de pruebas estadísticas el nivel de significación utilizado será $\alpha = 0,05$. Los análisis estadísticos se realizarán con el programa SPSS v 18.0.

5. PLAN DE TRABAJO.

Todos los pacientes incluidos en el estudio son revisados habitualmente en consulta externa del Hospital Virgen de la Arrixaca por el servicio de aparato digestivo y hepatología (Dr. Pons). Antes de comenzar la retirada paulatina de la inmunosupresión los pacientes serán informados de las razones de tal actitud y posteriormente será necesario firmar un consentimiento informado, donde se especificarán los riesgos y beneficios de retirar los fármacos inmunosupresores, así como la voluntariedad de participar, permanecer o retirarse del estudio (Incluido como anexo). Todo el Proyecto propuesto será llevado a cabo en los distintos Servicios y Laboratorios del Hospital Universitario "Virgen de la Arrixaca", con excepción de la técnica de gases-masa que será llevada a cabo en el Servicio CEBAS (CSIC) de la Universidad de Murcia.

Año 1.- Evaluación de los pacientes. Organización del grupo de estudio prospectivo. Responsables: Dr. Pons. Comienzo del proceso controlado de retirada de la IS. Obtención de biopsias hepáticas. Responsable: Dr. Pons y Dr. De la Peña. Toma de muestras de sangre. Responsables: Dra. Martínez-Alarcon. Durante este primer año se realizará principalmente el análisis de

las diferentes subpoblaciones leucocitarias mediante citometría de flujo y las determinaciones bioquímicas que se llevan a cabo de forma rutinaria. Responsables: Dra. Revilla-Nuin, Dr. Baroja, África de Béjar.

Año 2.- Seguimiento de los pacientes sometidos a retirada de la IS. Responsables: Dr. Pons. Obtención de biopsias hepáticas. Responsable: Dr. Pons y Dr. De la Peña. Toma de muestras de sangre. Responsables: Dra. Martínez- Alarcon. ELISAS de hepcidina-25 e IL-35. Análisis del estado de metilación de la región de TSDR de FOXP3. Determinación de adenosina y ATP en suero. Responsables: Dra. Revilla-Nuin, Dr. Baroja, África de Béjar.

Año 3.-Seguimiento de los pacientes. Análisis de los datos clínicos. Responsables: Dr. Pons, Dra. Martínez-Alarcon, Dr. De la Peña. Análisis estadísticos. Responsables: Dra. Revilla-Nuin, Dr. Baroja, Dra. Martínez-Alarcón, Dr. Martínez-Cáceres, Servicio de Apoyo de la FFIS. Valoración global de los resultados. Responsables: Todo el equipo investigador.

7. EXPERIENCIA DEL EQUIPO INVESTIGADOR SOBRE EL TEMA.

El personal del equipo tiene amplia experiencia en el campo del trasplante hepático, habiendo participado sus miembros en el proyecto que se viene desarrollando en nuestro hospital desde 1988. El Dr. Pons es miembro activo del equipo de trasplante hepático en la Región de Murcia, dirigido por el Profesor Pascual Parrilla Paricio, desde su comienzo, y actualmente forma parte del CIBERhd. Los Drs. Revilla-Nuin y Baroja-Mazo tienen amplia experiencia como investigadores en el campo de la biología molecular, bioquímica e inmunología, como refleja su CV, mientras que la Dra. Martínez-Alarcón tiene un amplio Currículum en el mundo de la investigación clínica y ha estado muchos años llevando a cabo trabajos como enfermera de investigación. Fruto de esta experiencia, en los últimos años se han realizado numerosas tesis doctorales sobre trasplante hepático en el departamento de Cirugía de la Universidad de Murcia, dirigido por el Profesor Dr. Pascual Parrilla Paricio. Además, los profesionales de nuestro hospital han realizado más de 100 publicaciones

sobre trasplante hepático, en revistas internacionales. Por otro lado, el equipo ya tiene experiencia en el estudio de tolerancia a largo plazo en pacientes con trasplante hepático, habiendo obtenido financiación en el año 2003 a través del Fondo de Investigaciones Sanitarias para el proyecto titulado "ESTUDIO DEL PERFIL CLINICO E INMUNOLOGICO EN PACIENTES CON TRASPLANTE HEPATICO TRAS RETIRADA COMPLETA DE LA INMUNOSUPRESION"(FIS PI021403). Nuestro grupo ha sido el primer grupo español que publicó un artículo sobre tolerancia operacional en una revista de impacto (**Pons J A, Yelamos J, Ramirez P, et al. Endothelial cell chimerism does not influence allograft tolerance in liver transplant patients after withdrawal of immunosuppression. Transplantation 2003;75:1045-1047**), habiendo publicado tras este primero, otros trabajos originales y revisiones en revistas de prestigio: Pons J A, Revilla-Nuin B, Baroja-Mazo, A et al. FoxP3 in peripheral blood is associated with operational tolerance in liver transplant patients during immunosuppression withdrawal. **Transplantation** 2008 86: 1370-1378.

Martínez-Llordella M, Lozano JJ et al. Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. **J Clin Invest** 2008. 118: 2845-2857 Pons J A, Ramírez P, Revilla-Nuin B, Baroja-Mazo A et al. Reversal of long-term metabolic, cardiovascular and renal complications after immunosuppression withdrawal in liver-transplant patients. **Clinical Transplantation** 2009. 23:329-336.

Development of immune tolerance in liver transplantation. **Gastroenterol. Hepatol.** 2011; 34:154-169 (Revisión) Pons J A, Revilla-Nuin B, Baroja-Mazo A et al. Regulatroy T cells in transplantation. Capítulo 22. Sección II: Immunology issues in transplantation. Título: Experimental organ transplantation. **Nova Science Publishers, Inc., New York, USA.** March 31, 2012 (Capítulo Libro - Aceptado).

Además, actualmente el grupo está participando en un ensayo clínico dirigido por el Dr. Pons titulado: "Fotoaféresis extracorpórea en el trasplante hepático. Ensayo clínico en fase I/II de seguridad y eficacia en pacientes con retirada progresiva de la inmunosupresión", del programa de

Ayudas para el fomento de la investigación clínica independiente-DIRECCIÓN GENERAL DE FARMACIA Y PRODUCTOS SANITARIOS (2012) Gran parte de los investigadores tienen cursos acreditados para el manejo del paquete estadístico SPSS y cursos de estadística básica en investigación, pero además, serán asesorados por la plataforma estadística de la Fundación para la Formación y las Investigaciones Sanitarias de la Región de Murcia (FFIS).

8. MEDIOS DISPONIBLES PARA LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO.

En el hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, se dispone del instrumental y tecnología suficiente para todo tipo de seguimiento clínico, intervención quirúrgica, e inmunológico relacionados con el trasplante hepático. Actualmente se dispone de una Unidad específica con camas, personal de enfermería y médico, para pacientes con trasplantes de órganos y médula ósea así como dos consultas semanales específicas de trasplante hepático. Además se dispone de:

Use the "Insert Citation" button to add citations to this document.

Laboratorio de Biología Molecular totalmente equipado para la extracción de ADN, ARN, PCR en tiempo real, pirosecuenciador, etc.

Arcones de -80°C para el almacenamiento de muestras de suero.

Laboratorio de Biología celular totalmente equipado con citómetro FACScalibur, lector de placas...

Laboratorio de instrumentación científica con HPLC en el SAI de la Universidad de Murcia.

9. JUSTIFICACIÓN DETALLADA DE LAS PARTIDAS PRESUPUESTARIAS DETALLADAS.

No se solicita material inventariable, pues disponemos de las instalaciones e instrumentación suficientes para desarrollar los objetivos propuestos. El Servicio de Apoyo a la Investigación (SA) ofrece unas tarifas para la utilización del HPLC por horas. Serán necesarias unas 100 h para llevar a cabo el estudio de concentración de ATP y adenosina en suero. De igual forma, los gastos en anticuerpos, kits de biología molecular, productos

químicos, etc. son necesarios para la obtención de los objetivos propuestos.

Los gastos de viaje son necesarios para la presentación de los resultados obtenidos en congresos nacionales y/o internacionales.

Gastos derivados de la publicación de los resultados, puesto que en algunos casos puede ser necesario incluir en la publicación de resultados fotos de inmunohistoquímica en color, lo que supone un gasto adicional importante.

10. PRESUPUESTO SOLICITADO.

1. Gastos de Personal Euros

2. Gastos de Ejecución

A) Adquisición de bienes y contratación de servicios: (Bienes inventariable, material fungible y otros gastos)

Anticuerpos y reactivos para citometría de flujo: 35.000 euros.

Reactivos de biología molecular (Kits extracción RNA, DNA, bisulfito, primers...): 20.000 euros.

PCR arrays (RNA y miRNA): 40.000 euros.

Columna y reactivos HPLC: 2.000 euros.

Kits de ELISA: 10.000 euros.

Servicio de HPLC (SAI-Univ. Murcia): 100 h 600 euros.

Reactivos generales (productos químicos, tubos sangre, etc...): 10.000 euros.

Gastos de publicación: 2.000 euros.

Inscripciones congresos nacionales e internacionales: 3.000 euros.

Subtotal Gastos Bienes y Servicios: 122.600 euros.

B) Gastos de Viajes

Asistencia a Congresos Nacionales cada año del Proyecto (3 Congresos):

3.000 euros.

Asistencia a Congresos Internacionales al final del Proyecto (2 Congresos):

5.000 euros.

Subtotal Gastos Viajes: 8.000.

Subtotal Gastos Ejecución: 130.600.

Total Presupuesto: 130.600.

11. RESULTADOS.

Características demográficas de los pacientes.

Variables	Healthy	Non-Tol	Tol
Número de pacientes (n)	16	23	24
Edad [Media \pm SE; mediana (rango)]	[48.75 \pm 1.995; 46 (40-62)]	[63.87 \pm 1.815; 66 (45-76)] ^{b***}	[69.08 \pm 1.777; 70 (52-83)] ^{b***}
Edad de trasplante [Media \pm SE; mediana (rango)]		[54.22 \pm 2.234; 57 (32-66)]	[53.58 \pm 1.672; 54 (40-65)]
Años desde el trasplante [Media \pm SE; mediana (rango)]		[6.13 \pm 0.594; 5 (4-14)]	[10.79 \pm 0.878; 12 (4-18)] ^{a***}
Sexo (n; %)			
Hombre	(11; 70)	(19; 83)	(22; 92)
Mujer	(5; 30)	(4; 17)	(2; 8)
Comorbilidades (n;%)			
Diabetes		(9; 40)	(15; 63)
Hipertensión		(19; 83)	(20; 84)
Hiperlipidemia		(10; 47)	(14; 58)
Disfunción renal		(4; 18)	(8; 31)
Enfermedad (n; %)			

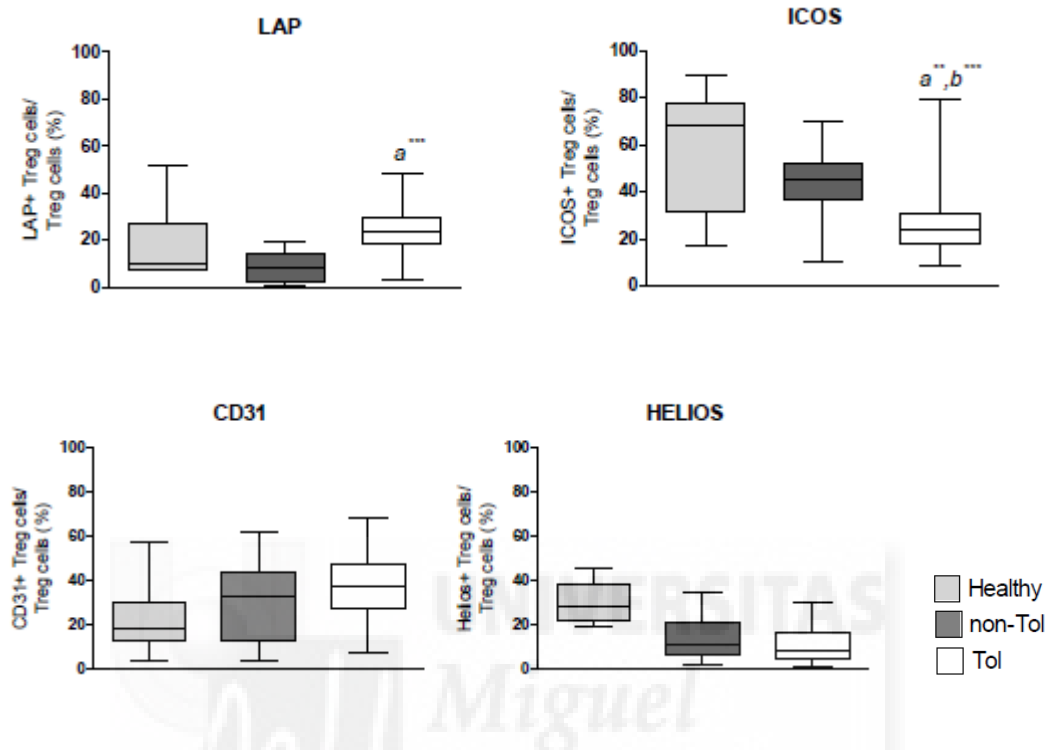
Cirrosis alcohólica	(18; 78.4)	(12; 50)
VHB	(2; 8.7)	(7; 29.1)
VHC		(3; 12.5)
Enfermedad de Wilson		(1; 4.2)
Cirrosis biliar secundaria	(1; 4.3)	
Cirrosis criptogénica hepática	(1; 4.3)	
Fibrosis hepática congénita	(1; 4.3)	
Fármaco inmunosupresor (n; %)		
Ciclosporina A	(1; 4.5)	(3; 12)
Tacrolimus	(21; 91)	(10; 42)
Mycofenolato mofetil		(7; 29)
Sirolimus, Everolimus	(1; 4.5)	(4; 17)

VHB: Hepatitis B virus; VHC: Hepatitis C virus. *a* representa diferencias estadísticamente significativas entre los grupos Tolerantes *vs* No Tolerantes, mientras que *b* representa diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo sano. *** $p \leq 0.001$.

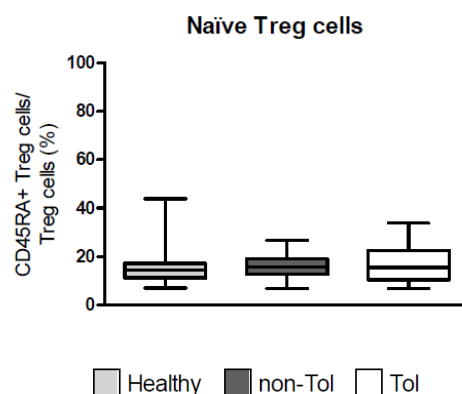
En cuanto al análisis de las diferentes subpoblaciones leucocitarias obtuvimos los siguientes resultados:

- a) Respecto a los marcadores de células Treg analizados por citometría de flujo, observamos que la expresión de LAP fue mayor en el grupo tolerante que en el no tolerante, pero no encontramos diferencias con respecto al grupo sano. En el caso de ICOS, cuya expresión resultó menor en tolerantes que en no tolerantes, si se observaron diferencias al compararlo con el grupo control. Al analizar los resultados obtenidos para CD31 y HELIOS, no encontramos

diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos. (*a* representa diferencias estadísticamente significativas entre los grupos Tolerantes *vs* No Tolerantes, mientras que *b* representa diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo sano. *** $p \leq 0.001$),

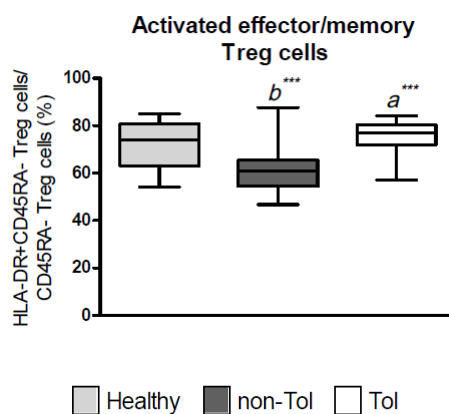


- b) Identificamos Tregs naïve (CD45RA+) y células efectoras de memoria (CD45RA-). En este caso, no se encontraron diferencias entre los grupos.



- c) Sin embargo, cuando la activación de las células Tregs memoria efectoras se analizó mediante el uso de HLA-DR como marcador superficial, observamos que los pacientes no tolerantes presentan en circulación menos células Tregs efectoras memoria activas en

comparación con los otros dos grupos (*a* representa diferencias estadísticamente significativas entre los grupos Tolerantes *vs* No Tolerantes, mientras que *b* representa diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo sano. *** $p \leq 0.001$).



12. BIBLIOGRAFÍA.

1. Roberts MS, Angus DC, Bryce CL, Valenta Z, Weissfeld L. Survival After Liver Transplantation in the United States : A Disease-Specific Analysis of the UNOS Database. *Liver Transpl.* 2004;10(7):886– 97.
2. Furukawa H, Todo S. Evolution of Immunosuppression in Liver Transplantation: Contribution of Cyclosporine. *Transpl Proc.* 2004;36:274– 84.
3. Scott LJ, McKeage K KS. Tacrolimus a further update of its use in the management of organ transplantation. *Drugs.* 2003;63:1247– 97.
4. Calne RY, Sells RA, Pena J R, Davis DR, Millard PR, Herbertson BM, et al. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature.* 1969;223:472– 6.
5. Qian S, Lu L, Fu F, Li Y, Li W, Starzl TE, et al. Apoptosis within spontaneously accepted mouse liver. *J Immunol.* 1997;158(10):4654– 61.
6. Farges O, Morris PJ. Spontaneous acceptance of liver allografts in the rat: analysis of the immune response. *Transplantation.* 1994;57:171– 7.
7. Pons JA, Yélamos J, Ramírez P, Oliver-Bonet M, Sánchez A, Rodríguez-Gago M, et al. Endothelial cell chimerism does not influence allograft tolerance in liver transplant patients after withdrawal of immunosuppression. *Transplantation.* 2003;75:1045– 7.
8. Martinez, O.M., Rosen HR. Basic concepts in transplant immunology. *Liver Transpl.* 2005;11:370– 81.
9. Sanchez-Fueyo A, Strom TB. Immunological tolerance and liver transplantation. *J Hepatol.* 2004;41(5):698– 705.
10. Pons JA, Ramirez P, Revilla-Nuin B, Pascual D, Baroja-Mazo A.

- Immunosuppression withdrawal improves long-term metabolic parameters, cardiovascular risk factors and renal function in liver transplant patients. *Clin Transpl.* 2009;23:329– 36.
11. Calne RY. Prope tolerance: The future of organ transplantation– from the laboratory to the clinic. *Clin Transpl.* 2004;77:930– 2.
 12. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155(3):1151– 64.
 13. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity.* 2009;30:636– 45.
 14. Li Y, Koshiba T, Yoshizawa A, Yonekawa Y, Masuda K, Ito A, et al. Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *Am J Transpl.* 2004;4(12):2118– 25.
 15. Martínez-Llordella M, Puig-Pey I, Orlando G, Ramoni M, Tisone G, Rimola A, et al. Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transpl.* 2007;7(2):309– 19.
 16. Pons J A, Revilla-Nuin B, Baroja-Mazo A, Ramirez P, Martinez-Alarcon L . FoxP3 in peripheral blood is associated with operational tolerance in liver transplant patients during immunosuppression withdrawal. *Transplantation.* 2008;86:1370– 8.
 17. Bunnag S, Allanach K, Jhangri GS, Sis B, Einecke G, Mengel M, et al. FOXP3 expression in human kidney transplant biopsies is associated with rejection and time post transplant but not with favorable outcomes. *Am J Transpl.* 2008;8:1423– 33.
 18. Li Y, Xiangdong Z, Cheng D, Haga H, Tsuruyama T, Wood K, et al. The Presence of Foxp3 Expressing T Cells Within Grafts of Tolerant Human Liver Transplant Recipients. *Transplantation.* 2008;86:1837– 43.
 19. Ito T, Hanabuchi S, Wang YH, Park WR, Arima K, Bover L, et al. Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity.* 2008;28(6):870– 80.
 20. Spoerl S, Li XC. Regulatory T cells and the quest for transplant tolerance. *Discov Med.* 2011;11:25– 34.
 21. Zheng SG, Wang J. Cutting edge: Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF-beta are resistant to Th17 conversion by IL-6. *J Immunol.* 2008;180(11):7112– 6.
 22. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol.* 2010;184(7):3433– 41.
 23. Baron U, Floess S, Wieczorek G, Baumann K, Grützkau A, Dong J, et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol.* 2007;37(9):2378– 89.
 24. Wieczorek G, Asemisen A, Model F, Turbachova I, Floess S, Liebenberg V, et al. Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer Res.* 2009;69(2):599– 608.

25. Ye F, Yan S, Xu L, Jiang Z, Liu N, Xiong S, et al. Tr1 regulatory T cells induced by ConA pretreatment prevent mice from ConA-induced hepatitis. *Immunol Lett.* 2009;122(2):198–207.
26. Collison LW, Chaturvedi V, Henderson AL, Giacomini PR, Guy C, Bankoti J, et al. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol.* 2010;11(12):1093–101.
27. Zhang ZX, Yang L, Young KJ, DuTemple B. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med.* 2000;6(7):782–9.
28. Mauri C EM. The “short” history of regulatory B cells. *Trends Immunol.* 2008;29(1):34–40.
29. Pallier A, Hillion S, Danger R, Giral M, Racapé M. Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney Int.* 2010;78:503–13.
30. Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Invest.* 2007;117(5):1147–54.
31. Martínez-Llordella M, Lozano JJ, Puig-Pey I, Orlando G, Tisone G, Lerut J, et al. Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *J Clin Invest.* 2008;118(8):2845–57.
32. Strom TB, Koulmanda M. Recently discovered t cell subsets cannot keep their commitments. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20:1677–80.
33. Hammerich L, Heymann Facke TF. Role of IL-17 and Th17 cells in liver diseases. *Clin Dev Immunol.* 2011.
34. Munn DH. Physiologic Control of the Functional Status of Foxp3+ Regulatory T Cells. *J Immunol.* 2011;186:4535–40.
35. Sánchez-Fueyo A, Strom TB. Immunologic basis of graft rejection and tolerance following transplantation of liver or other solid organs. *Gastroenterology.* 2011;140(1):51–64.
36. Martinon F, Gaide O, Petrilli V, Mayor A, Tschopp J. NALP inflammasomes: a central role in innate immunity. *Semin Immunopathol.* 2007;29:213–29.
37. Barberà-Cremades M, Baroja-Mazo A, Gomez AI, Machado F, Di Virgilio F. 2X7 receptor-stimulation causes fever via PGE2 and IL-1 β release. *FASEB J.* 2012;26(7):2951–62.
38. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood.* 2007;110(4):1225–32.
39. Junger WG. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(3):201–12.
40. Bohne F, Martínez-Llordella M, Lozano JJ, Miquel R, Benítez C, Londoño MC, et al. Intra-graft expression of genes involved in iron homeostasis predicts the development of operational tolerance in human liver transplantation. *J Clin Invest.* 2012;122(1):368–82.

