

Tolerancia inmunológica y trasplante renal

Francisco Herrera-Gómez¹, Mercedes Nocito-Colón², Débora Martín-García³, Ruth Herrera-Bugnazet⁴, Álvaro Nava-Rebollo¹, Beatriz Andrés-Martín¹, Anunciación González-López¹, Jesús Grande-Villoria¹, Raúl Ortiz de Lejarazu-Leonardo², Jesús Bustamante-Bustamante³

¹ Servicio de Nefrología. Hospital Virgen de la Concha. Zamora

² Servicio de Microbiología e Inmunología. Hospital Clínico Universitario de Valladolid

³ Servicio de Nefrología. Hospital Clínico Universitario de Valladolid

⁴ Servicio de Oncología. Complejo Asistencial de Burgos

NefroPlus 2014;6(1):15-9

doi:10.3265/NefroPlus.pre2014.Sep.12613

RESUMEN

El papel crucial de las células T reguladoras en la tolerancia de los injertos se ha visto claramente en numerosos modelos animales. No obstante, delimitar este rol en trasplante con humanos es tarea difícil. Alternativamente, la exploración del componente regulador de la respuesta alo-inmune podría convertirse en un biomarcador diagnóstico y pronóstico muy útil para el seguimiento a largo plazo de los pacientes trasplantados.

Palabras clave: Células T reguladoras. Inmunotolerancia. Inmunosupresión. Inmunocontrol.

CÉLULAS T REGULADORAS

Las células reguladoras están compuestas por diferentes subpoblaciones que comparten la propiedad de modular la respuesta inmune. En situación fisiológica, la producción tímica contribuye mayoritariamente a la constitución del compartimento linfocitario regulador periférico¹. Además de los linfocitos T reguladores naturales (nTreg), se ha demostrado in vitro e in vivo la existencia de dos subtipos de linfocitos reguladores denominados inducibles (iTreg), puesto que aparecen tras la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ nativos en periferia bajo condiciones especiales^{2,3} (tabla 1): 1) los iTregs propiamente dichos, generados in vitro e in vivo a partir de células CD4⁺CD25⁻ por contacto de su TCR (*T cell receptor*) con el antígeno en presencia de TGF- β (*transforming growth factor- β*), con todas las características fenotípicas y funcionales de los nTregs, y 2) las células Tr1, productoras de interleucina (IL)-10 principalmente y de TGF- β por la acción de iTregs Foxp3⁺, pudiendo expresar Foxp3 (*forkhead box p3*) al activarse, y pudiendo generarse in vitro e in vivo por estimulación antigénica repetida por efecto de IL-10 e interferón-alfa (INF- α). Las células Tr1 ejercen su acción supresora principalmente mediante la producción de IL-10 y en menor grado por la secreción de TGF- β ; también lo hacen modulando la activación de células dendríticas y regulando la producción de citocinas². Las células

Tr1 y nTreg podrían controlar sinérgicamente la respuesta alo-inmune. Se ha visto que los nTreg inducen la diferenciación de linfocitos T nativos en células Tr1 in vitro en presencia de células dendríticas alogénicas². Una de las grandes diferencias entre iTreg y nTreg radica en la expresión del gen *Foxp3*, que parece ser menos estable en los primeros, como lo demuestran la metilación de sus histonas, acetilación y estado de los microARN⁴⁻⁶. Maganto-García⁷ ha demostrado recientemente que los iTreg Foxp3⁺, pero no los nTreg, pueden interactuar eficazmente con selectinas endoteliales y migrar a través del endotelio activado in vitro. Por otra parte, los iTreg Foxp3⁺ se adhieren al endotelio inflamado in vivo y sus productos de secreción bloquean la inflamación aguda in vivo. Los iTreg Foxp3⁺ serían reclutados en el seno de los tejidos inflamados para ayudar a regular la inflamación independientemente de su influencia sobre las células efectoras, mediante la supresión directa de la activación endotelial y el bloqueo del reclutamiento leucocitario⁷.

BIOMARCADORES DE INMUNOTOLERANCIA

Las células reguladoras Foxp3⁺ han demostrado su capacidad para controlar la respuesta alo-inmune en diversos modelos de inducción de tolerancia en el ratón. No obstante, delimitar este rol en trasplante con humanos es tarea difícil. Muchos autores han intentado encontrar respuestas analizando la expresión de Foxp3 en injertos renales. Los estudios son heterogéneos en cuanto a sus aspectos clínicos y metodológicos, y arrojan en consecuencia resultados contradictorios. Intentando abrirse camino entre estos

Correspondencia: Francisco Herrera Gómez

Servicio de Nefrología, Hospital Virgen de la Concha.
Avenida Requejo, 35, 49022, Zamora
fherrerag@saludcastillayleon.es

resultados discordantes, el análisis en profundidad de la literatura muestra que la expresión de Foxp3 guarda relación con un buen o mal pronóstico según la biopsia del injerto presente, respectivamente, un bajo o alto grado de inflamación. No hay que olvidar que uno de los principales problemas al estudiar la expresión de Foxp3 en los contextos inflamatorios radica en que el gen *Foxp3* puede expresarse en las células T efectoras recientemente activadas, lo mismo que en los Treg (células T reguladoras Foxp3+) *bona fide*. Alternativamente, la exploración del componente regulador de la respuesta alo-inmune podría convertirse en un biomarcador diagnóstico y pronóstico muy útil para el seguimiento a largo plazo de los trasplantados. La puesta en evidencia de que el fenotipo de membrana CD4⁺CD25⁺CD127⁻ permite caracterizar las células T reguladoras Foxp3⁺ (nTreg e iTreg conjuntamente)⁸⁻¹⁰ autoriza teóricamente el seguimiento rutinario de Treg en los trasplantados (inmunocontrol).

En 2012, Lin¹¹ postuló la hipótesis de que la respuesta inmune global de las células CD4⁺ activadas (CD4⁺ CD25⁺) puede determinarse por el equilibrio o la proporción entre células T circulantes que expresan Foxp3 y aquellas que no lo expresan. Analizó el fenotipo por citometría de flujo de células mononucleares de sangre periférica de 95 trasplantados renales, 17 insuficientes renales en estadio terminal y 18 controles sanos. El porcentaje global de células CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ es relevante biológicamente y se relaciona con la tasa de filtrado glomerular

medido por MDRD-4¹¹. Las células CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ se encuentran disminuidas en los trasplantados renales, comparando a los insuficientes renales en estadio terminal y controles sanos, lo que sugiere una influencia importante de la inmunosupresión crónica¹¹. No obstante, los trasplantados e insuficientes renales terminales conjuntamente muestran una proporción elevada de células T Foxp3⁺, entre las células CD4⁺ CD25⁺, contrariamente a los sujetos normales¹¹, lo que se explica en parte por la disregulación inmunitaria y la susceptibilidad a las infecciones características de la enfermedad renal crónica^{12,13}. No encuentran correlación entre el número de células T reguladoras Foxp3⁺ y el tiempo postrasplante, a pesar de las observaciones de otros equipos¹⁴⁻¹⁶. No obstante, resulta interesante que encontrasen correlación entre células Treg y malignidad postrasplante (la mayoría, carcinomas cutáneos no melanoma)¹¹.

LA CONTRAPARTIDA DE LA INMUNOTOLERANCIA

Si la adquisición o restauración de un estado de tolerancia inmunológica constituye uno de los objetivos principales en el trasplante y en enfermedades autoinmunes, es por el contrario deletérea para la respuesta contra agentes infecciosos y células tumorales. Uno de los objetivos de la investigación es poder, por consiguiente, inducir un estado de «tolerancia inmunitaria operacional», es decir, la ausencia de respuesta inmunitaria patógena

Tabla 1. Propiedades de las células reguladoras

	nTreg	iTreg Th3	iTreg Tr1
Ontogenia	Origen tímico Necesaria la recepción de señal por el TCR y co-estimulación de CD28	Generados en periferia (tejidos inflamados) Necesaria la recepción de señal por el TCR en presencia de TGF-β	Generados en periferia por estimulación antigénica repetida en presencia de iTreg Th3 Productoras de IL-10 y de TGF-β
Fenotipo	Foxp3, CD25, GITR, CTLA-4	Foxp3, CD25, GITR, CTLA-4, CD45RA ^{low}	Foxp3 ^{low} , CD25 ^{-(low)} , CD45RA ^{low}
Marcadores específicos	Helios, Nrp1	Ndfip1, Igfbp4, Dapl1	
Mecanismo de supresión	Contacto celular, citólisis por granzima	TGF-β dependiente	IL-10 dependiente
Rol	Supresión de células dendríticas y células T efectoras	Modulación de la respuesta inflamatoria insitu	Modulación de la respuesta inflamatoria insitu
Requerimientos citoquímicos	IL-2 (proliferación, estabilidad)	TGF-β, ácido retinoico, rapamicina, IL-2	IL-10, IFN-α
Epigenética	TSDR completamente desmetilado en el locus Foxp3	Desmetilación incompleta del TSDR en el locus Foxp3	Desmetilación incompleta del TSDR en el locus Foxp3

CTLA-4: *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*; Dpl1: *death-associated protein-like 1*; Foxp3: *forkhead box p3*; GITR: *glucocorticoid-induced TNFR family-related gene*; Igfbp4: *insulin-like growth factor-binding protein 4*; IL: interleucina; iTreg: linfocitos T reguladores inducibles; Ndfip1: *Needd4 family interacting protein-1*; Nrp-1: neurofilina-1; nTreg: linfocitos T reguladores naturales; TCR: *T cell receptor*; TGF-β: *transforming growth factor-β*.

frente a los antígenos del injerto, sin que se afecte la capacidad del receptor para reaccionar de manera eficaz contra diversos antígenos exógenos.

Ciertos patógenos, en particular virales (virus de la inmunodeficiencia humana¹⁷) y parasitarios (*Leishmaniae*¹⁸, *Plasmodium*¹⁹), pueden escapar a una respuesta inmunitaria eficaz mediante el reclutamiento y expansión preferente de células reguladoras Foxp3⁺. El corolario negativo sería el riesgo de ruptura de un estado de tolerancia dominante por una infección. Estos datos ponen en perspectiva la asociación clínica bastante conocida en trasplante renal entre infección por citomegalovirus y rechazo agudo²⁰.

Los receptores de órganos presentan 200 veces más riesgo de carcinoma epidermoide cutáneo (CEC), mucho más que los pacientes que siguen una corticoterapia crónica o los afectados de artritis reumatoide en tratamiento de fondo, que presentan 2-4 veces más riesgo de CEC respecto a la población general^{21,22}. Los CEC parecen escapar a la respuesta citotóxica, al menos en parte, por la regulación a la baja de la E-selectina vascular y por el reclutamiento preferente de células T reguladoras²³. Además, estos tumores contienen menos células T CD8⁺ CLA⁺ (*cutaneous lymphocyte-associated antigen*), esenciales para la vigilancia inmunitaria eficaz de la piel. Como demuestra Clark²³, los CEC tratados con imiquimod, un agonista del receptor Toll 7, antes de la escisión, muestran inducción de E-selectina en los vasos tumorales, reclutamiento de células T CLA⁺ y regresión histológica del tumor.

Predecir en el laboratorio el curso que seguirá un CEC en el trasplantado renal de momento no es posible. La caracterización de las subpoblaciones de células T reguladoras podría ser de utilidad. Carroll²⁴ emite la hipótesis de que el aumento de Treg se asociaría al desarrollo de CEC y otros tumores en el trasplantado renal. Analizó el fenotipo por citometría de flujo de células mononucleares de sangre periférica de trasplantados renales con y sin CEC. Se conformaron dos grupos de acuerdo a edad, sexo y tratamiento inmunosupresor. A los pacientes se les siguió durante una media de 340 días para identificar los marcadores que podían predecir estos tumores. Como explica Carroll, respecto al nivel encontrado en los pacientes sin CEC, el número de células CD8⁺ CD28⁻ y CD4⁺ CD127^{low} CD69⁺ Foxp3⁺ aumenta en los pacientes con CEC y podría ser predictivo de malos resultados en distintos tipos de cáncer. Un número elevado de células CD4⁺ Foxp3⁺ y bajo de células *natural killer* puede predecir un alto riesgo de recidiva. Una ratio CD8/Foxp3 baja en las piezas de exéresis de tumores también se asocia con la recidiva. Este estudio es el primero en demostrar un vínculo entre el fenotipo Treg y el riesgo de recidiva de cáncer en trasplantados. Queda pendiente saber si estas conclusiones son aplicables en el contexto de la inmunosupresión y en los pacientes expuestos a niveles elevados de radiación ultravioleta.

Datos recientes sugieren que los linfocitos T reguladores disminuyen la progresión de la aterosclerosis y que IL-10 y TGF- β ejercen efectos antiaterogénicos²⁵⁻²⁷.

IMPACTO DE LA INMUNOSUPRESIÓN

En los trasplantados renales que reciben inducción con anti-timoglobulina o alemtuzumab se produce una depleción profunda de células T nativas²⁸. Las células T memoria que resistieron a la depleción comienzan a desarrollarse desde el primer mes^{29,30}. A la par, una salida tímica de Treg se produce después de la inducción³¹. Esto sugiere que la frecuencia elevada de células Foxp3⁺ circulantes observada refleja su mayor contribución al control del compartimento de células T memoria³² y eventualmente a la modulación de la activación de linfocitos T³³ más que una expansión selectiva de Treg³¹. Pruebas convincentes indican que la proliferación inducida por la linfopenia (proliferación homeostática) pone trabas al control efectivo de la respuesta inmune por los Treg. Antes que todo, las células T memoria son mucho menos sensibles al efecto supresor de los Treg que las células T nativas^{34,35}. La proliferación homeostática por sí sola hace resistentes las células efectoras a la inducción de tolerancia³⁶. Esto explica por qué la inducción con alemtuzumab seguida de una inmunosupresión primaria con sirolimus se ha asociado a una elevada tasa de rechazo agudo³⁷.

Muchos de los fármacos inmunosupresores que se utilizan en trasplante pueden tener efectos nefastos en la inducción y función de los Treg, mientras que otros por el contrario parecen favorecer a estas células e incluso podrían tener un efecto benéfico. Los anticalcineurínicos afectan negativamente a las células reguladoras por diferentes mecanismos, sobre todo por la reducción de la cooperación entre NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) y los factores de transcripción de Foxp3³⁸, y por el bloqueo de la secreción de IL-2³⁹. Esto deja dudas de si una baja expresión de Foxp3 podría ser el signo de la toxicidad por anticalcineurínicos. En modelos animales y humanos, los inhibidores de la calcineurina inhiben la generación de Treg y su capacidad supresora⁴⁰⁻⁴⁴, por lo que la limitación de la dosis y del tiempo de exposición a estos medicamentos puede ser esencial para los futuros protocolos de inducción de tolerancia. En contraste, rapamicina favorece probablemente la supervivencia y función de los Treg^{40,42,45-48}, pero se echan en falta pruebas claras de un efecto benéfico de los inhibidores de mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) en estudios llevados a cabo en el ser humano, debido a efectos ambivalentes protolerancia y proinflamatorio⁴⁹. Los estudios aportan pruebas de que los monocitos de pacientes trasplantados renales que reciben sirolimus presentan un alto perfil proinflamatorio frente a lipopolisacárido respecto a los que reciben anticalcineurínicos^{50,51}. Una estimulación de la respuesta innata, que implica células mieloides, puede explicar los desórdenes inflamatorios observados bajo tratamiento con inhibidores de mTOR (ImTOR): la fiebre de origen desconocido o la neumonitis son algunos ejemplos. Esto concuerda con lo observado en la clínica, donde la neumonitis asociada a los ImTOR puede producirse en algunos casos por una infección viral o bacteriana auténtica, y su progresión agravada y prolongada por la exposición a los ImTOR.

Conceptos clave

1. Las células T reguladoras juegan un rol importantísimo en el control de la respuesta inmune adaptativa.
2. El seguimiento del inmunofenotipo de subpoblaciones linfocitarias reguladoras circulantes se recomienda con vistas al desarrollo de estrategias de inmunovigilancia en trasplante (inmunocontrol).
3. Un estado de tolerancia alo-específico preservaría la respuesta inmune dirigida contra células tumorales y agentes infecciosos (tolerancia operacional).
4. Muchos de los fármacos inmunosupresores que se utilizan en trasplante pueden tener efectos nefastos en la inducción y función de los Treg.
5. Los inhibidores de mTOR favorecen probablemente la supervivencia y función de los Treg, pero se echan en falta pruebas claras de un efecto protolerancia a causa de efectos proinflamatorios.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Claude Lambert de St-Étienne (Francia) la lectura experta y crítica del presente manuscrito.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no tienen conflictos de interés potenciales relacionados con los contenidos de este artículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Wang YH, Cao W, Liu YJ. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4 CD25 regulatory T cells in human thymus. *Nature* 2005;436:1181-5.
2. Muller YD, Seebach JD, Bühler LH, Pascual M, Golshayan D. Transplantation tolerance: Clinical potential of regulatory T cells. *Self Nonself* 2011;2:26-34.
3. Bilate AM, Lafaille JJ. Induced CD4 Foxp3 regulatory T cells in immune tolerance. *Annu Rev Immunol* 2012;30:733-58.
4. Baron U, Floees 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;37:2378-89.
5. Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, Peng XP, Forbush K, Rudensky AY. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature* 2010;463:808-12.
6. Lu LF, Thai TH, Calado DP, Chaudhry A, Kubo M, Tanaka K, et al. Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. *Immunity* 2009;30:80-91.
7. Maganto-García E, Bu D-X, Tarrío ML, Alcaide P, Newton G, Griffin GK, et al. Foxp3+ -inducible regulatory T cells suppress endothelial activation and leukocyte recruitment. *J Immunol* 2011;187:3521-9.
8. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4 Treg cells. *J Exp Med* 2006;203:1701-11.
9. Schmidt A, Oberle N, Krammer PH. Molecular mechanisms of Treg-mediated T cell suppression. *Front Immunol* 2012;3:51.
10. Kmiecik M, Gowda M, Graham L, Godder K, Bear HD, Marincola FM, et al. Human T cells express CD25 and Foxp3 upon activation and exhibit effector/memory phenotypes without any regulatory/suppressor function. *J Transl Med* 2009;7:89.
11. Lin WX, Christiansen D, Fu LL, Roberts MA, Sandrin MS, Ierino FL. Foxp3 T cells in peripheral blood of renal transplant recipients and clinical correlations. *Nephrology (Carlton)* 2012;17:415-22.
12. Descamps-Latscha B, Chatenoud L. T cells and B cells in chronic renal failure. *Semin Nephrol* 1996;16:183-91.
13. Girndt M, Sester U, Sester M, Kaul H, Köhler H. Impaired cellular immune function in patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:2807-10.
14. Abadja F, Alamartine E, Berthoux F, Mariat C, Genin C, Lambert C. Quantification of circulating regulatory T cells by flow cytometry in kidney transplant patients after basiliximab induction therapy. *Transplantation* 2010;89:366-8.
15. Kreijveld E, Koenen HJ, Van Cranenbroek B, van Rijssen E, Joosten I, Hilbrands LB. Immunological monitoring of renal transplant recipients to predict acute allograft rejection following the discontinuation of tacrolimus. *PLoS ONE* 2008;3:e2711.
16. Mittal SK, Sharma RK, Gupta A, Naik S. Increased interleukin-10 production without expansion of CD4 CD25 T-regulatory cells in early stable renal transplant patients on calcineurin inhibitors. *Transplantation* 2009;88:435-41.
17. Kinter AL, Hennessey M, Bell A, Kern S, Lin Y, Daucher M, et al. CD25(+)/CD4(+) regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4(+) and CD8(+) HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status. *J Exp Med* 2004;200:331-43.
18. Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4 CD25 regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature* 2002;420:502-7.
19. Walther M, Tongren JE, Andrews L, Korbel D, King E, Fletcher H, et al. Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4 CD25 regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity* 2005;23:287-96.

20. Kotton CN, Fishman JA. Viral infection in the renal transplant recipient. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1758-74.
21. Karagas MR, Cushing GL, Jr, Greenberg ER, Mott LA, Spencer SK, Nierenberg DW. Non-melanoma skin cancers and glucocorticoid therapy. *Br J Cancer* 2001;85:683-6.
22. Buchbindet R, Barber M, Heuzenroeder L, Wluka AE, Giles G, Hall S, et al. Incidence of melanoma and other malignancies among rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate. *Arthritis Rheum* 2008;59:794-9.
23. Clark RA, Huang SJ, Murphy GF, Mollet IG, Hijnen D, Muthukuru M, et al. Human squamous cell carcinomas evade the immune response by down-regulation of vascular E-selectin and recruitment of regulatory T cells. *J Exp Med* 2008;205:2221-34.
24. Carroll RP, Segundo DS, Hollowood K, Marafioti T, Clark TG, Harden PN, et al. Immune phenotype predicts risk for posttransplantation squamous cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:713-22.
25. Ducloux D, Kazory A, Chalopin J-M. Coronary disease in renal transplantation: how to take charge and assess the risk coronary? In: Lesavre P, Drüeke T, Legendre C, Niaudet P, Grünfeld J-P. *Adv Nephrol Necker Hosp (Chicago, IL): Mosby-Year book; 2007. pp. 91-104.*
26. Mallat Z, Besnard S, Duriez M, Deleuze V, Emmanuel F, Bureau MF, et al. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res* 1999;85:e17-e24.
27. Robertson AK, Rudling M, Zhou X, Gorelik L, Flavell RA, Hansson GK. Disruption of TGF-beta signaling in T cells accelerates atherosclerosis. *J Clin Invest* 2003;112:1342-50.
28. Pearl JP, Parris J, Hale DA, Hoffmann SC, Bernstein WB, McCoy KL, et al. Immunocompetent T-cells with a memory-like phenotype are the dominant cell type following antibody-mediated T-cell depletion. *Am J Transplant* 2005;5:465-74.
29. Lakkis FG, Sayegh MH. Memory T cells: a hurdle to immunologic tolerance. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2402-10.
30. Neujahr DC, Chen C, Huang X, Markmann JF, Cobbold S, Waldmann H, et al. Accelerated memory cell homeostasis during T cell depletion and approaches to overcome it. *J Immunol* 2006;176:4632-9.
31. Lopez M, Clarkson MR, Albin M, Sayegh MH, Najafian N. A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4 CD25 Foxp3 regulatory T cells. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2844-53.
32. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4 T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 2009;30:899-911.
33. Broady R, Yu J, Levings MK. ATG-induced expression of FOXP3 in human CD4 T cells in vitro is associated with T-cell activation and not the induction of FOXP3 T regulatory cells. *Blood* 2009;114:5003-6.
34. Cobbold SP, Castejon R, Adams E, Zelenika D, Graca L, Humm S, et al. Induction of Foxp3 regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J Immunol* 2004;172:6003-10.
35. Lakkis FG, Sayegh MH. Memory T cells: a hurdle to immunologic tolerance. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2402-10.
36. Wu Z, Bensinger SJ, Zhang J, Chen C, Yuan X, Huang X, et al. Homeostatic proliferation is a barrier to transplantation tolerance. *Nat Med* 2004;10:87-92.
37. Flechner SM, Friend PJ, Brockmann J, Ismail HR, Zilveti M, Goldfarb D, et al. Alemtuzumab induction and sirolimus plus mycophenolate mofetil maintenance for CNIs and steroid-free kidney transplant immunosuppression. *Am J Transplant* 2005;5:3009-14.
38. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 2006;126:375-87.
39. Kang HG, Zhang D, Degauque N, Mariat C, Alexopoulos S, Zheng XX. Effects of cyclosporine on transplant tolerance: the role of IL-2. *Am J Transplant* 2007;7:1907-16.
40. Akimova T, Kamath BM, Goebel JW, Meyers KE, Rand EB, Hawkins A, et al. Differing effects of rapamycin or calcineurin inhibitor on T-regulatory cells in pediatric liver and kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2012;12:3449-61.
41. Fourounas C, Dousdampanis P, Sakellaraki P, Rodi M, Georgakopoulos T, Vlachojannis JG, et al. Different immunosuppressive combinations on T-cell regulation in renal transplant recipients. *Am J Nephrol* 2010;32:1-9.
42. Gao W, Lu Y, El Essawy B, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB. Contrasting effects of cyclosporine and rapamycin in de novo generation of alloantigen-specific regulatory T cells. *Am J Transplant* 2007;7:1722-32.
43. Presser D, Sester U, Mohrbach J, Janssen M, Köhler H, Sester M. Differential kinetics of effector and regulatory T cells in patients on calcineurin inhibitor-based drug regimens. *Kidney Int* 2009;76:557-66.
44. Wang H, Zhao L, Sun Z, Sun L, Zhang B, Zhao Y. A potential side effect of cyclosporin A: inhibition of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in mice. *Transplantation* 2006;82:1484-92.
45. Haxhinasto S, Mathis D, Benoist C. The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4 Foxp3 cells. *J Exp Med* 2008;205:565-74.
46. Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo MG. Rapamycin selectively expands CD4 CD25 FoxP3 regulatory T cells. *Blood* 2005;105:4743-8.
47. San Segundo D, Ruiz JC, Izquierdo M, Fernández-Fresnedo G, Gómez-Alamillo C, Merino R, et al. Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4 CD25 FOXP3 regulatory T cells in renal transplant recipients. *Transplantation* 2006;82:550-7.
48. Lopez-Hoyos M, San Segundo D, Fernández-Fresnedo G, Marín MJ, González-Martín V, Arias M. Regulatory T cells in renal transplantation and modulation by immunosuppression. *Transplantation* 2009;88:S31-9.
49. Zuber J, Hermine O, Chatenoud L, Legendre C. Harnessing regulatory T cells for transplant tolerance in the clinic through mTOR inhibition: myth or reality? *Curr Opin Organ Transplant* 2011;16:606-13.
50. Weichhart T, Haidinger M, Katholnig K, Kopecky C, Poglitsch M, Lassnig C, et al. Inhibition of mTOR blocks the anti-inflammatory effects of glucocorticoids in myeloid immune cells. *Blood* 2011;117:4273-83.
51. Haidinger M, Poglitsch M, Geyeregger R, Kasturi S, Zeyda M, Zlabinger GJ, et al. A versatile role of mammalian target of rapamycin in human dendritic cell function and differentiation. *J Immunol* 2010;185:3919-31.