

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Inmunoregulación en trasplante renal por células mieloides
supresoras y células B reguladoras**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alberto Utrero Rico

Directora

Estela Paz Artal

Madrid

© Alberto Utrero Rico, 2021

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Inmunoregulación en trasplante renal por células mieloides
supresoras y células B reguladoras

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

Alberto Utrero Rico

DIRECTORA

Estela Paz Artal

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría empezar agradeciendo a mi directora de tesis, Estela, su tutela y su esfuerzo para que hoy podamos estar aquí. Pero también quiero agradecerte la oportunidad que me diste al poder participar en tu grupo de investigación y todos tus conocimientos y consejos profesionales y personales tan valiosos transmitidos a lo largo de todos estos años y que hoy van conmigo. Gracias también a Rocío y Fran por su incansable día a día en la investigación y por sus aportes tanto profesionales como personales. Donde estoy hoy es en gran medida gracias a vosotros.

Gracias a los compañeros de la 7º: Cecilia, Marta, Patri, Patricia y Miguel. Gracias por todos esos momentos tanto dentro como fuera del laboratorio. El grupo es ahora mucho mejor y seguirá creciendo gracias a vosotros.

Gracias a Paloma, has sido otra profesional en la que fijarme, además gracias por todos tus consejos y ayuda. A Elena, por todas esas tardes mano a mano con los experimentos que se hacían mucho más llevaderas. A todos los facultativos y residentes del servicio de inmunología porque de todos vosotros he aprendido mucho, ya sea en forma de consejos o preguntas en los seminarios como en conversaciones. Gracias Marijose, aunque esta vez soy yo el que se va primero. Gracias Esther, por tu ayuda siempre que la he necesitado y por tu compromiso con la investigación. Gracias Pablo, Luis y Antonio por todos los conocimientos y consejos durante todos estos años. Además, gracias a todos los técnicos del servicio por vuestra colaboración y ayuda.

Gracias a todos los compañeros de investigación de la 6º y la 7º. Gracias al personal de otros servicios por vuestra colaboración e implicación, así como a todos los pacientes, siempre dispuestos a ayudar cuando se trata de investigación.

Gracias Prof. Vincenzo Bronte y Prof. Stefano Ugel por darme la oportunidad de ir a vuestro grupo. Gracias a todos los profesionales del laboratorio por acogerme y regalarme todos esos momentos.

Gracias a mi familia. Gracias papá, porque aunque ya no estés, te noto y siento cerca dándome fuerzas y animándome en cada momento del camino. A papá y mamá, porque con 18 años me permitisteis empezar mi camino con todas vuestras enseñanzas que me han hecho ser la persona que soy hoy, y que llevo grabadas dentro. A mis hermanas porque cuando estoy con vosotras me siento en casa. A la yeya siempre preocupada por mi bienestar y mi futuro. A todos mis tíos, tías, primos y primas por vuestro apoyo en todas las decisiones que voy tomando.

Siempre tengo ganas de ir a Badajoz y desconectar, todo culpa vuestra Gusy, David, Ernesto, Héctor, Pablo, Isma, Dani, Sergio, Miguel, Juanjo Montero, Mario... Gracias por acompañarme todos estos años y por lo venideros.

Gracias Alcalá y Madrid por todos estos años, todas las experiencias y todas las personas que he conocido.

INDICE

ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN	13
RESUMEN	15
SUMMARY	18
INTRODUCCIÓN	21
Enfermedad renal crónica avanzada y tratamiento renal sustitutivo.....	23
Trasplante renal	26
Reacción aloinmune y rechazo.....	28
Tratamiento inmunosupresor	31
Terapia de inducción	31
Terapia de mantenimiento.....	32
Tratamiento del rechazo	34
Otras complicaciones: infecciones y cáncer.....	35
Infecciones	35
Cáncer.....	37
Seguimiento post-trasplante y biomarcadores.....	39
Poblaciones celulares del sistema inmunológico relevantes en la respuesta al trasplante renal	42
Células supresoras de estirpe mieloide (<i>Myeloid derived suppressor cells, MDSC</i>)	42
Definición, fenotipo y función	42
Papel de las MDSC en patología.....	48
Células T cooperadoras foliculares.....	50
Definición y funciones	50
Papel de las cTfh en trasplante renal	54
Células B reguladoras	55
Definición y origen	55
Papel en el trasplante de órganos.....	64
JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	67
JUSTIFICACION.....	69
HIPOTESIS.....	70
OBJETIVOS GENERALES	70
CAPITULOS.....	71

CAPITULO 1: <i>Early posttransplant mobilization of monocytic myeloid-derived suppressor cell correlates with increase in soluble immunosuppressive factors and predicts cancer in kidney recipients</i>	73
OBJETIVOS	74
CONCLUSIONES	76
PUBLICACIÓN	77
CAPITULO 2: <i>Imbalance favoring follicular helper T cells over IL10⁺ regulatory B cells is detrimental for the kidney allograft</i>	97
OBJETIVOS	98
CONCLUSIONES	100
PUBLICACIÓN	101
DISCUSION.....	121
CONCLUSIONES	143
BIBLIOGRAFIA	147
ANEXOS	161

ABREVIATURAS

AhR: *aryl hydrocarbon receptor*, receptor de *aryl hydrocarbon*

APRIL: *A proliferation-inducing ligand*, ligando A inductor de proliferación

BCR: *b-cell receptor*, receptor de células B

BPAR: *Biopsy-proven acute rejection*, rechazo agudo diagnosticado por biopsia

Breg: *regulatory B cells*, células B reguladoras

C/EBP: *CCAAT-enhancer-binding protein*, proteína de unión al potenciador CCAAT

CCR: *C-C chemokine receptor type*, receptor de quimioquinas tipo C-C

CpG: regiones del genoma con altas cantidades del dinucleótido CpG

cTfh: *circulating follicular helper T cells*, células T cooperadoras foliculares circulantes

CXCL: *C-X-C motif chemokine ligand*, ligando del motivo C-X-C.

CXCR: *C-X-C Motif Chemokine Receptor*, receptor de quimioquinas con el motivo C-X-C

DAMP: *damage associated molecular patterns*, patrones moleculares asociados a daño

EAE: *Experimental autoimmune encephalomyelitis*, encefalomiелitis autoinmune

experimental

eMDSC: *early stage MDSC*

ERC: enfermedad renal crónica

ERCA: enfermedad renal crónica avanzada

Fas: *apoptosis antigen 1*, antígeno 1 de apoptosis.

FasL: *Fas ligand*, ligando de Fas

FKBP12: *FK506 binding protein 12*, proteína 12 de unión a FK506

G-CSF: *granulocyte colony-stimulating factor*

G-MDSC: MDSC granulocíticas

GM-CSF: *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos

HLA: *human leukocyte antigen*, antígeno leucocitario humano

HMGB1: *high-mobility group box protein 1*

ICOS: *Inducible T Cell Costimulator*, coestimulador inducible de células T

ICOSL: *ICOS ligand*, ligando de ICOS

IDO: *Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase*, Indolamina 2,3 dioxigenasa

IFN: interferón

Ig: inmunoglobulina

IL: interleucina

IMC: *immature myeloid cells*, células mieloides inmaduras

iNKT: *invariant NKT*, células NKT invariantes

iNOS: sintasa inducible de óxido nítrico

IRF8: factor de regulación de interferón 8

LOX-1: *lectin-type oxidized LDL receptor 1*, receptor 1 de LDL oxidado tipo lectina

LPS: lipopolisacárido

M-CSF: *macrophage colony-stimulating factor*, factor estimulador de colonias de macrófagos

M-MDSC: MDSC monocíticas

MDSC: *myeloid derived suppressor cells*, células supresoras de estirpe mieloide

MHC: *major histocompatibility complex*, complejo principal de histocompatibilidad

miRNA: micro ARN

MMF: micofenolato

MMP9: *matrix metalloproteinase 9*, metalo-proteinasa de matrix 9

MSC: *myeloid suppressor cells*, células mieloides supresoras

mTOR: *mammalian target of rapamycin*, diana de la rapamicina en células de mamífero

NF- κ B: *nuclear factor kappa-beta*, factor nuclear kappa-beta

NK: *natural killer cell*, célula natural asesina

NKT: *natural killer T cells*, células T asesinas naturales

NO: *nitric oxide*, óxido nítrico

PAMP: *pathogen associated molecular patterns*, patrones moleculares asociados a patógenos

PD: *programmed cell death protein*, proteína inductora de muerte celular programada

PD-L: *PD ligand*, ligando de PD

PGE2: prostaglandina E2

PMA: *Phorbol 12-myristate 13-acetate*

PMN-MDSC: *polymorphonuclear MDSC*, MDSC polimorfonucleares

RFG: ratio de filtración glomerular

ROS: *reactive oxygen species*, especies reactivas de oxígeno

SLAM: *Signaling lymphocytic activation molecule*, moléculas de activación de señalización linfocitaria

STAT: *Signal transducer and activator of transcription*, señal transductora y activadora de la transcripción

TACI: *transmembrane activator and CAML interactor*, interaccionador CAML y activador transmembrana

TCR: *T-cell receptor*, receptor de células T

Tfh: *follicular helper T cells*, células T cooperadoras foliculares

TGFβ: *transforming growth factor beta*, factor de crecimiento transformante beta

Th: *helper T cells*, células T cooperadoras

TIM: *T-cell immunoglobulin and mucin domain*, dominio de mucina y de inmunoglobulina en las células T

TLR: *toll-like receptors*, receptores tipo Toll

TNFα: *tumor necrosis factor alpha*, factor de necrosis tumoral alfa

Treg: linfocitos T reguladores

TRS: terapia renal sustitutiva

RESUMEN

RESUMEN

Introducción: El trasplante renal es la mejor opción terapéutica para los pacientes con enfermedad renal crónica avanzada (ERCA). La mejora en sus resultados ha sido, en gran medida, posible gracias a los fármacos inmunosupresores, con los que se ha evitado la respuesta del sistema inmunológico sobre el injerto pero que dan lugar a múltiples complicaciones como infecciones y cáncer. A pesar de ello, siguen existiendo rechazos y la supervivencia del injerto a largo plazo sigue siendo subóptima. Esto hace necesaria la búsqueda de nuevos biomarcadores no invasivos que detecten de forma precoz el rechazo y el deterioro del injerto, así como otras complicaciones. Recientemente, se han identificado poblaciones celulares minoritarias del sistema inmunológico con potentes capacidades inmunoregulatoras que podrían tener un papel importante en la tolerancia del injerto. Entre estas poblaciones celulares se encuentran las células supresoras de estirpe mieloide monocíticas (M-MDSC), con potentes funciones inmunosupresoras sobre las respuestas inmunes, y los linfocitos B reguladores (IL10⁺Breg), capaces de producir interleucina (IL)10 e inhibir la función efectora de los linfocitos T.

Objetivos: Analizar la dinámica de las células supresoras de estirpe mieloide y de los linfocitos B reguladores de forma prospectiva en pacientes receptores de un trasplante renal, así como evaluar su relación con eventos post-trasplante. Estudiar la relación de los linfocitos B reguladores con los linfocitos T cooperadores foliculares, células encargadas de la generación de plasmablastos productores de anticuerpos con alta especificidad.

Resultados: Las M-MDSC incrementan muy significativamente tras la cirugía del trasplante renal y se mantienen significativamente elevadas durante el primer año de

seguimiento con respecto al pre-trasplante, independientemente de los fármacos inmunosupresores. Tras el trasplante, estas células tienen la capacidad de inhibir la proliferación de los linfocitos T y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias. Los pacientes receptores de un trasplante renal que desarrollaron cáncer *de novo* mostraron los niveles más altos de M-MDSC durante el primer mes post-trasplante, y las M-MDSC surgen como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de tumores *de novo* durante los dos primeros años post-trasplante. Los niveles de M-MDSC se correlacionaron significativamente con niveles superiores de las moléculas inmunosupresoras IL10 y la metaloproteinasa MMP9 en suero, y con niveles inferiores de actividad antioxidante total.

Con respecto a las células IL10⁺Breg, encontramos niveles superiores en pacientes con ERCA en comparación a controles sanos. Tras el trasplante disminuyen muy significativamente y se mantienen disminuidas durante el primer año post-trasplante. Altos niveles de IL10⁺Breg pre-trasplante se asociaron con mayor incidencia de rechazo agudo del injerto de forma independiente al resto de factores clínicos. Pero además, los pacientes trasplantados que desarrollaron rechazo agudo del injerto mostraron reducciones de IL10⁺Breg desde el pre- al post-trasplante significativamente superiores al resto de pacientes. Existe una correlación directa y significativa entre los niveles pre-trasplante de IL10⁺Breg y cTfh, que se desregula en el post-trasplante hacia mayores niveles de cTfh y menores de IL10⁺Breg. Los pacientes trasplantados con los mayores aumentos del ratio cTfh/IL10⁺Breg en el post-trasplante mostraron mayor incidencias de rechazos agudos.

Conclusiones: Las M-MDSC aumentan muy significativamente post-trasplante, se asocian con un ambiente inmunosupresor y predicen la aparición de tumores de novo durante los dos primeros años post-trasplante. Las células IL10⁺Breg están aumentadas en los pacientes con ERCA y aquellos con los niveles más altos tienen mayor riesgo de sufrir rechazo agudo del injerto en el post-trasplante. Los pacientes con reducciones más marcadas de células IL10⁺Breg en el post-trasplante mostraron mayor riesgo de rechazo y pérdida del injerto. Hay una relación directa entre los niveles de IL10⁺Breg y las cTfh en el pre-trasplante y una desregulación hacia mayores niveles de cTfh en el post-trasplante tiene lugar en aquellos pacientes trasplantados que posteriormente sufrieron rechazo agudo del injerto.

SUMMARY

Background: Kidney transplantation is the best therapeutic option for patients with end-stage renal disease (ESRD). Despite the improvement in results has been mostly possible thanks to the use of immunosuppressive drugs which avoid immune response against the allograft, rejections still happen, the long-term graft survival remains suboptimal, and drug-induced immunosuppression associated with complications such as infections and cancer. This makes it necessary to search for new non-invasive biomarkers that predict graft rejection and deterioration, as well as other complications. Recently, minority cell populations with powerful immunoregulatory capacities have emerged which could play an important role in graft tolerance. These populations include the monocytic myeloid derived suppressor cells (M-MDSC), which have potent immunosuppressive effects on the immune responses, and regulatory B lymphocytes (IL10⁺Breg), which can produce IL10 and inhibit the effector function of T lymphocytes.

Objectives: To prospectively analyze the dynamics of M-MDSC and IL10⁺Breg in kidney transplant recipients, as well as to evaluate their relationship with post-transplant events. To study the relationship of IL10⁺Breg with cTfh, which generate the necessary signals for the generation of antibody-producing B cells with high specificity.

Results: M-MDSC increase significantly after kidney transplant surgery and remain significantly elevated during the first post-transplant year compared to pre-transplantation, regardless of immunosuppressive drugs. After transplantation, these cells have the ability to inhibit the proliferation of T lymphocytes and the release of pro-inflammatory cytokines. Kidney transplant recipients who developed *de novo* cancer showed the highest levels of M-MDSC during the first month after transplantation, and

M-MDSC emerged as an independent risk factor for the development of *de novo* tumors during the first two years post-transplantation. M-MDSC levels significantly correlated with higher levels of immunosuppressive molecules IL10 and MMP9 metalloproteinase in serum and with lower levels of total antioxidant activity.

With regard to IL10⁺Breg cells, we found higher levels in ESRD patients, before transplantation, compared to healthy controls. After transplantation, IL10⁺Breg decrease significantly and remain low during the first year after transplantation. High pre-transplant levels of IL10⁺Breg associated with higher incidence of acute graft rejection independently of other clinical factors. Transplant patients who developed acute graft rejection showed significantly higher IL10⁺Breg reduction from pre- to post-transplantation than non-rejectors. There is a direct and significant correlation between the pre-transplantation levels of IL10⁺Breg and cTfh, which is deregulated in the post-transplant towards higher levels of cTfh and lower levels of IL10⁺Breg. The increase in the cTfh/IL10⁺Breg ratio post-transplantation correlated with acute kidney rejection and graft failure.

Conclusion: M-MDSC increase significantly post-transplantation, are associated with an immunosuppressive environment and predict *de novo* tumor development during the first two post-transplant years. IL10⁺Breg cells are increased in patients with ESRD, and patients with highest reductions of IL10⁺Breg after transplantation are at higher risk of acute rejection and graft loss. There is a direct relationship between the levels of IL10⁺Breg and cTfh in the pre-transplantation and a deregulation towards higher levels of cTfh in the post-transplant takes place in those transplanted patients who subsequently suffered acute graft rejection.

INTRODUCCIÓN

Enfermedad renal crónica avanzada y tratamiento renal sustitutivo

La condición de enfermedad renal crónica (ERC) se define como una disminución de la función renal por al menos 3 meses. La ERC surge a partir de muchas enfermedades heterogéneas que alteran la función y la estructura del riñón de forma irreversible (1, 2). Globalmente, las causas más comunes de la ERC son la diabetes y la hipertensión. España sigue la tendencia general y así en nuestro país las causas más comunes de ERC son diabetes ($\approx 26\%$), etiologías no filiadas ($\approx 15\%$), causas vasculares ($\approx 15\%$), glomerulonefritis ($\approx 14\%$) y pielonefritis/nefropatía intersticial crónica ($\approx 9\%$) (3).

La prevalencia global de la ERC es muy variable entre países de todo el mundo, desde un mínimo del 7% hasta un máximo del 24%, siendo más prevalente en los países más desarrollados (4). En España, un 15.1% de la población sufre ERC y es más prevalente en hombres, en personas de mayor edad y en pacientes con patologías cardiovasculares (2).

El mejor indicador de la función renal global es el ratio de filtración glomerular (RFG), que representa la cantidad de fluido filtrado por las nefronas por unidad de tiempo y de superficie (5); que junto a la albuminuria (6) nos permite identificar los diferentes estadios de la ERC en los que puede encontrarse el paciente. Aunque también existen otros criterios para la determinación de la ERC: sedimento urinario anormal, histología anormal, anomalías estructurales detectadas por imagen o trasplantes previos (7-9).

La guías internacionales determinan que un valor de RFG menor de 60 mL/min por 1.73 m² es indicativo de ERC, que es más grave cuanto mayor sea el ratio albúmina:creatinina (albuminuria). De acuerdo a los valores de RFG, se han establecido 6 estadios diferentes

de la ERC (G1-G5); mientras que de acuerdo a los valores de albuminuria se establecen 3 grupos (A1-A3) (Figura 1). El valor combinado de ambos parámetros nos permite definir de forma más detallada el estado del paciente y así determinar su riesgo agrupado global, calculado a partir de los riesgos individuales de progresión de la enfermedad, fracaso renal y mortalidad (Figura 1).

Filtrado glomerular Categorías, descripción y rango (ml/min/1,73 m ²) ^o			Albuminuria Categorías, descripción y rangos		
			A 1	A 2	A 3
			Normal a ligeramente aumentada	Moderadamente aumentada	Gravemente aumentada
			< 30 mg/g	30 - 300 mg/g	> 300 mg/g
G 1	Normal o elevado	≥ 90			
G 2	Ligeramente disminuido	60 - 89			
G 3 a	Ligera a moderadamente disminuido	45 - 59			
G 3 b	Moderada a gravemente disminuido	30 - 44			
G 4	Gravemente disminuido	15 - 29			
G 5	Fallo renal	< 15			

Figura 1. Riesgo global asociado al estadio de la ERC de acuerdo a los valores de RFG y albuminuria. Verde identifica riesgo bajo, amarillo riesgo moderado, naranja riesgo alto y rojo riesgo muy alto. Adaptado de (2).

Cuando el RFG llega a valores inferiores a 15 mL/min por 1.73 m², el paciente alcanza el estado de enfermedad renal crónica avanzada (ERCA), condición en la que la función renal no es suficiente como para mantener la supervivencia del individuo y por lo tanto son necesarias aproximaciones terapéuticas que sirvan como terapia renal sustitutiva

(TRS). La mediana de supervivencia cuando un paciente alcanza la ERCA es de 6.49 años (IC 95%: 6.41 – 6.57) (3).

Los tipos de TRS son la diálisis o el trasplante renal. La diálisis es el TRS más común y es un proceso mediante el cual los productos de desecho de la sangre, comúnmente eliminados a través de los riñones, son eliminados mediante circulación extracorpórea. La diálisis puede ser de dos tipos: hemodiálisis o diálisis peritoneal. La hemodiálisis ha sido y sigue siendo la TRS más prevalente, aunque la diálisis peritoneal va en aumento debido a que se ha observado que los pacientes tratados con diálisis peritoneal muestran una supervivencia global significativamente superior a los pacientes tratados con hemodiálisis (Hazard ratio para mortalidad: 0.53 [0.51-0.56], $p < 0.0001$) (Figura 2A).

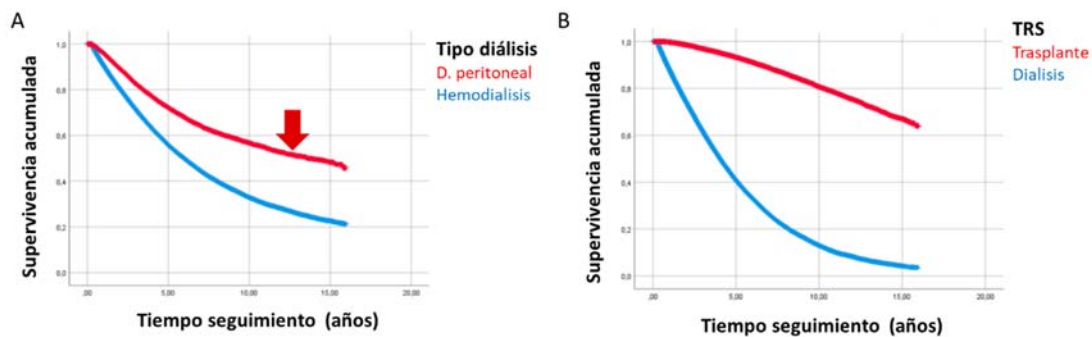


Figura 2. Supervivencia global de los pacientes en TRS. (A) Comparación de la supervivencia entre pacientes en hemodiálisis y diálisis peritoneal. (B) Comparación del TRS con diálisis o con trasplante renal. Adaptado de (3).

Además, la hemodiálisis requiere la asistencia permanente y varias veces a la semana al centro de diálisis, mientras que la diálisis peritoneal ofrece mayor independencia al paciente, ya que puede realizarse en el hogar. El trasplante renal no sólo ofrece una mayor calidad de vida que la diálisis, sino que las supervivencias globales de los

pacientes trasplantados son significativamente superiores (Hazard ratio: 0.10 [0.09-0.11], $p < 0.0001$) (Figura 2B). Por estos motivos y por su superior coste-eficiencia (10) el trasplante renal se ha consolidado como la opción terapéutica preferible para los pacientes con ERCA.

Trasplante renal

Para poder ser incluidos en la lista de espera de trasplante renal, los pacientes con ERCA no deben presentar una serie de contraindicaciones, que son divididas en absolutas y relativas. Las contraindicaciones absolutas incluyen: cáncer reciente o metastásico, infección activa aguda o crónica, alto riesgo de no sobrevivir a la cirugía, expectativa de vida menor de 2 años y enfermedad psiquiátrica grave, crónica y no controlada; mientras que las relativas incluyen: edad avanzada (>75 años), cáncer previo no controlado, malformación grave del tracto urinario, drogadicción o alcoholismo, incumplimiento terapéutico reiterado, nefropatía activa clínica o serológica, riesgo de recurrencia grave, hepatitis B con replicación viral activa, otra comorbilidad severa extra-renal, coagulopatía severa, retraso mental severo e infección por VIH complicada (11).

La mayoría de los trasplantes renales tiene lugar entre un donante y un receptor no emparentados, es decir, son alotrasplantes, si se denominan desde un punto de vista inmunogenético. Atendiendo al origen del injerto, existen tres tipos de donantes: donante cadáver en muerte encefálica, que representa en torno al 60% de los donantes, donante cadáver en asistolia, que representa en torno al 30% de los donantes, o donante vivo, que representa en torno al 10% (3, 12). De entre todos ellos, los injertos

procedentes de donantes cadáver en asistolia son los que presentan un mayor retraso de función tras el trasplante, que se define como la necesidad de diálisis en las dos primeras semanas post-trasplante; así como una mayor probabilidad de disfunción primaria del injerto, que es el requerimiento de diálisis tras el trasplante (13). Los injertos procedentes de donantes vivos muestran los mejores resultados de supervivencia del injerto. Estas diferencias son principalmente atribuidas a daños asociados a isquemia-reperfusión (proceso en el que el órgano es extraído del donante hasta que se implanta en el receptor, en el que sufre hipoxia y falta de riego sanguíneo, lo que daña el tejido), a diferencias en la compatibilidad donante-receptor y a la edad de los receptores (14). Otro de los factores que afecta a la supervivencia del injerto es el TRS con diálisis previo al trasplante. Se ha observado que la función del aloinjerto es mejor cuando el receptor no ha recibido TRS con diálisis previa al trasplante, lo que es poco habitual debido a la escasa disponibilidad de injertos renales. Sin embargo dentro del TRS con diálisis previa al trasplante, la diálisis peritoneal proporciona una ventaja para la supervivencia del injerto (15-17).

El éxito actual del trasplante renal ha sido posible gracias a una ardua labor investigadora a lo largo de muchos años, lo que, además de mejorar las habilidades quirúrgicas en torno al procedimiento, logró identificar al sistema inmunológico como uno de los principales impedimentos para el correcto funcionamiento del aloinjerto. Inicialmente se observó que los linfocitos T eran los causantes del reconocimiento y del daño al injerto causando el rechazo del órgano trasplantado, sin embargo, el conocimiento acerca del papel del sistema inmunológico en el trasplante de órganos ha evolucionado considerablemente (18).

Reacción aloinmune y rechazo

El sistema inmunológico es el conjunto de moléculas y células encargados de eliminar cualquier amenaza ajena a nuestro organismo. El sistema inmunológico puede dividirse en dos compartimentos: el innato y el adaptativo. El compartimento innato representa la primera línea de defensa frente a cualquier amenaza. Está constituido por mecanismos que reconocen patrones compartidos entre patógenos ó moléculas propias “de peligro” y establecen respuestas rápidas. La inmunidad innata incluye además células capaces de fagocitar patógenos o sus restos, y, especialmente en el caso de las proteínas, procesarlas y presentarlas en moléculas del complejo principal de histocompatibilidad, que se denomina antígeno leucocitario en humanos (HLA), a células del compartimento adaptativo. En contraposición a la inmunidad innata, la inmunidad adaptativa es capaz de generar células que reconocen antígenos con extraordinaria especificidad y establece respuestas más duraderas e intensas que requieren mayor tiempo para su desarrollo. Dentro del compartimento adaptativo, encontramos dos tipos celulares principales: los linfocitos T, encargados de la inmunidad celular y los linfocitos B, encargados de la inmunidad humoral (19).

En individuos inmunocompetentes, el trasplante de un órgano entre individuos genéticamente idénticos no genera respuesta inmunológica frente al injerto; sin embargo, en el trasplante entre individuos genéticamente diferentes tiene lugar el aloreconocimiento del injerto. El aloreconocimiento se refiere a la identificación de tejido alogénico, del aloinjerto, por el sistema inmune del receptor. Esto tiene lugar gracias al reconocimiento, por parte de los receptores de las células T (TCR) y B (BCR), de diferencias en sistemas polimórficos entre individuos, que actúan como antígenos.

Los principales polimorfismos son las moléculas del HLA de clase I y II y sus diferencias entre donante y receptor determinan la compatibilidad (20). La unión del HLA con el TCR establece la respuesta inmunológica adaptativa que se conoce como alorespuesta y conduce al rechazo del injerto. La alorespuesta conlleva la inflamación y distorsión del tejido trasplantado y la infiltración de células T específicas contra el injerto (21).

Existen tres vías de aloreconocimiento responsables del rechazo mediado por linfocitos T: la vía directa, vía indirecta y la vía semi-directa. En la vía directa, las células presentadoras de antígenos del donante presentan péptidos en moléculas del HLA de clase I a los linfocitos T CD8⁺ del receptor y en moléculas del HLA de clase II a los linfocitos T CD4⁺ del receptor. Mientras que los linfocitos T CD8⁺ reconocen los antígenos y generan respuestas citotóxicas, los linfocitos T CD4⁺ liberan citoquinas que promueven la respuesta inmunológica (cooperación) (22) (Figura 3A). En la vía indirecta, los linfocitos T reconocen péptidos derivados de proteínas HLA del donante que han sido previamente capturadas y son presentadas por células presentadoras de antígenos del receptor (23) (Figura 3B). En la vía semi-directa, las células dendríticas del receptor adquieren complejos HLA-péptido alogénico de células del donante y las presentan a los linfocitos T del receptor (23) (Figura 3C).

El compartimento de células B del sistema inmune adaptativo también tiene un papel importante en la alorespuesta, pues es responsable del rechazo humoral, mediante la producción de anticuerpos específicos frente al injerto. Estos anticuerpos son capaces de activar la vía clásica del complemento y unirse a receptores Fc en la superficie de células mieloides, lo que finalmente induce la muerte de la célula diana (24). Los anticuerpos más relevantes son los generados contra moléculas del HLA del donante,

que pueden existir pre-trasplante o aparecer *de novo* tras el trasplante. Ambos son deletéreos para la supervivencia del injerto y originan el rechazo mediado por anticuerpos (25, 26).

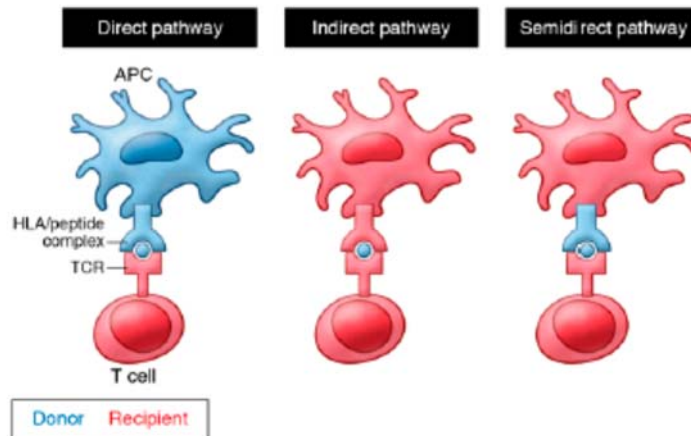


Figura 3. Vías de alorecognition. (A) Vía directa, (B) vía indirecta, y (C) vía semi-directa. Adaptado de (27).

De manera excepcional, a pesar de que haya alorecognition del injerto, existen situaciones en las que no hay rechazo del órgano trasplantado. En el trasplante clínico de órganos, principalmente de hígado, se ha observado que en algunos casos de pacientes trasplantados que dejan de tomar los fármacos inmunosupresores ocurre una aceptación espontánea del injerto y no tiene lugar el rechazo del órgano. A estos pacientes se les denomina tolerantes operacionales. Ciertas células del sistema inmune con función inmunosupresora, como las células T reguladoras, podrían estar jugando un papel muy importante en esta tolerancia (28-30).

Debido al alorecognition y al rechazo del injerto trasplantado, el éxito de los trasplantes a corto y largo plazo no hubiera sido posible sin el uso de drogas

inmunosupresoras, que actúan a diferentes niveles del aloreconocimiento evitando que el rechazo se desarrolle.

Tratamiento inmunosupresor

La estrategia inmunosupresora en el trasplante renal se centra en tres etapas principales: la inducción, el mantenimiento y el tratamiento del rechazo (31).

Terapia de inducción

El objetivo de la terapia de inducción es originar una inmunosupresión intensa pero de corta duración en el periodo perioperatorio y postoperatorio inmediato, cuando existe el riesgo más elevado de rechazo y para asegurar la implantación del injerto (32). En el trasplante renal suelen utilizarse terapias basadas en anticuerpos. Estas terapias se dividen en terapias deplecionantes y no deplecionantes. El tipo de terapia de inducción se escoge de acuerdo al riesgo inmunológico del paciente siguiendo las guías KDIGO (33).

En el centro de realización de este estudio, el Hospital Universitario 12 de Octubre, las terapias de inducción con anticuerpos más utilizadas incluyen:

- Anticuerpos anti-timocitos: se trata de anticuerpos policlonales que reconocen proteínas de la superficie de los linfocitos T. Su unión al ligando provoca la inactivación y la eliminación del linfocito T por medio de actividades citotóxicas (34, 35). Se utiliza en pacientes con alto riesgo inmunológico, como pacientes con un trasplante previo, hipersensibilizados (abundantes anticuerpos anti-HLA preformados, es decir, existentes antes del trasplante, debido principalmente a

embarazos, transfusiones o trasplantes previos) o jóvenes receptores con intensa respuesta inmunológica.

- Basiliximab: es un anticuerpo monoclonal quimérico no deplecionante que se une a la cadena alfa del receptor de IL2 (CD25) en la superficie de los linfocitos T, inhibiendo la proliferación y la diferenciación (36, 37). Se suele utilizar en pacientes con menor riesgo inmunológico, como aquellos con alta compatibilidad donante-receptor, en primer trasplante, mayores de 60 años o no sensibilizados.
- Hay pacientes que antes de trasplantarse presentan anticuerpos específicos contra su donante, en estos casos es necesario utilizar protocolos de desensibilización para asegurar el acceso al trasplante a este grupo de pacientes. Para ello se utiliza plasmaféresis, inmunoglobulinas intravenosas o rituximab, que es un anticuerpo monoclonal deplecionante anti-CD20 (38) (Figura 4).

Terapia de mantenimiento

El objetivo de la terapia de mantenimiento es mantener el sistema inmunológico del receptor en un estado en el que no genere respuesta frente al injerto durante el resto de vida del órgano. La terapia de mantenimiento puede incluir inhibidores de la calcineurina, agentes antiproliferativos, corticoides, inhibidores de mTOR y bloqueantes de la coestimulación. Una combinación de estos fármacos se inicia en el momento de la cirugía y se mantienen por el resto de vida del receptor. La terapia de mantenimiento varía mucho entre centros, siendo la más utilizada la combinación de tacrolimus, micofenolato y prednisona. Esta misma terapia es la que se utiliza comúnmente en el Hospital 12 de Octubre:

- Tacrólimus: es un macrólido derivado de *Streptomyces* que se une a FK506 de la proteína 12 (FKBP12) para formar un complejo que inhibe a la calcineurina (39). La calcineurina es una proteína encargada de la activación de la transcripción de IL2, citoquina que participa en la co-estimulación y diferenciación de los linfocitos T. La concentración plasmática de este fármaco debe ser controlada regularmente para mantenerla en rango terapéutico (5-10 ng/mL) ya que tiene efectos neuro- y nefro-tóxicos (40, 41).
- Micofenolato (MMF): es un agente antiproliferativo que inhibe la deshidrogenasa de inosina monofosfato, causando la inhibición de la síntesis de nucleótidos de guanina. Estos nucleótidos son esenciales para la proliferación de los linfocitos T y B (42).
- Prednisona: es un corticoide que tiene funciones anti-inflamatorias e inmunosupresoras mediante el bloqueo de la expresión de citoquinas por parte de los linfocitos T y de células mieloides (43). Más recientemente se ha observado que los corticoides promueven la diferenciación de las células T reguladoras (44) (Figura 4).

Es importante señalar que las terapias de inducción y mantenimiento se dirigen principalmente a la contención de la respuesta mediada por linfocitos T. Sin embargo, su efecto sobre otras poblaciones celulares del sistema inmune, como linfocitos B ó células mieloides, ha sido muy poco estudiado. Así, cabría pensar incluso que algunos de estos fármacos son deletéreos para poblaciones celulares inmunosupresoras o tolerogénicas que al receptor del trasplante le convendría conservar para mejorar la viabilidad del aloinjerto.

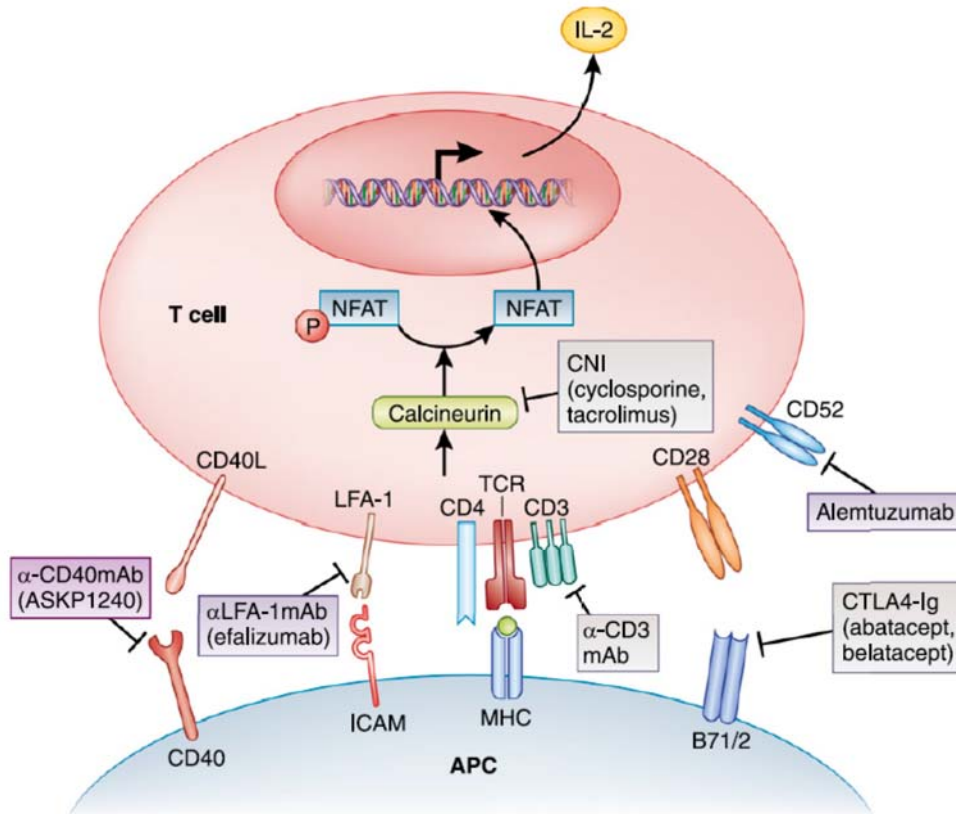


Figura 4. Drogas inmunosupresoras y dianas utilizadas en el trasplante de órganos. Belatacept inhibe la unión de CD80 con ligando, mientras que los anticuerpos anti células T o anti-timocitos tienen múltiples dianas. Ciclosporina y tacrolimus son dos inhibidores de la calcineurina. Basiliximab y Daclizumab son dos anticuerpos que inhiben la señalización a través de IL2. Rapamicina es un inhibidor de mTOR. Azatioprina y MMF son dos agentes anti-metabolito Adaptado de (45)

Tratamiento del rechazo

El rechazo del injerto debe tratarse acorde al origen. Bolos de corticoides suele ser la primera línea de tratamiento ante un rechazo celular, seguido de terapias de anticuerpos deplecionantes como timoglobulina, o no deplecionantes, como basiliximab. En el caso de rechazo mediado por anticuerpos, se utilizan terapias con anticuerpos deplecionantes como rituximab, inactivación de células productoras de anticuerpos con bortezomib, eliminación de anticuerpos del receptor mediante

plasmaféresis, utilizando inmunoglobulina intravenosa o inhibiendo la activación del complemento mediante eculizumab (46, 47).

En el trasplante clínico, la combinación de estas terapias inmunosupresoras han logrado prevenir el rechazo agudo del injerto, pero la pérdida del injerto debido a rechazo crónico, junto a toxicidad derivada de los fármacos y a diferentes eventos post-trasplante como infecciones o cáncer permanecen como un problema actual.

Otras complicaciones: infecciones y cáncer

Infecciones

Los pacientes trasplantados tienen un riesgo mayor de sufrir infecciones debido a dos factores principales: las exposiciones epidemiológicas y el estado neto de inmunosupresión (48). En el post-trasplante, las infecciones pueden promover el rechazo del injerto, oponerse a la tolerancia o incluso estimular la alorespuesta celular por reacción cruzada (49).

Basándonos en los patrones comunes de infecciones post-trasplante y el manejo de la inmunosupresión y de la profilaxis antimicrobiana, podemos describir una cronología con las infecciones más probables (Figura 5). Esta línea temporal se puede dividir en tres periodos:

Timeline of Common Post-Transplant Infections

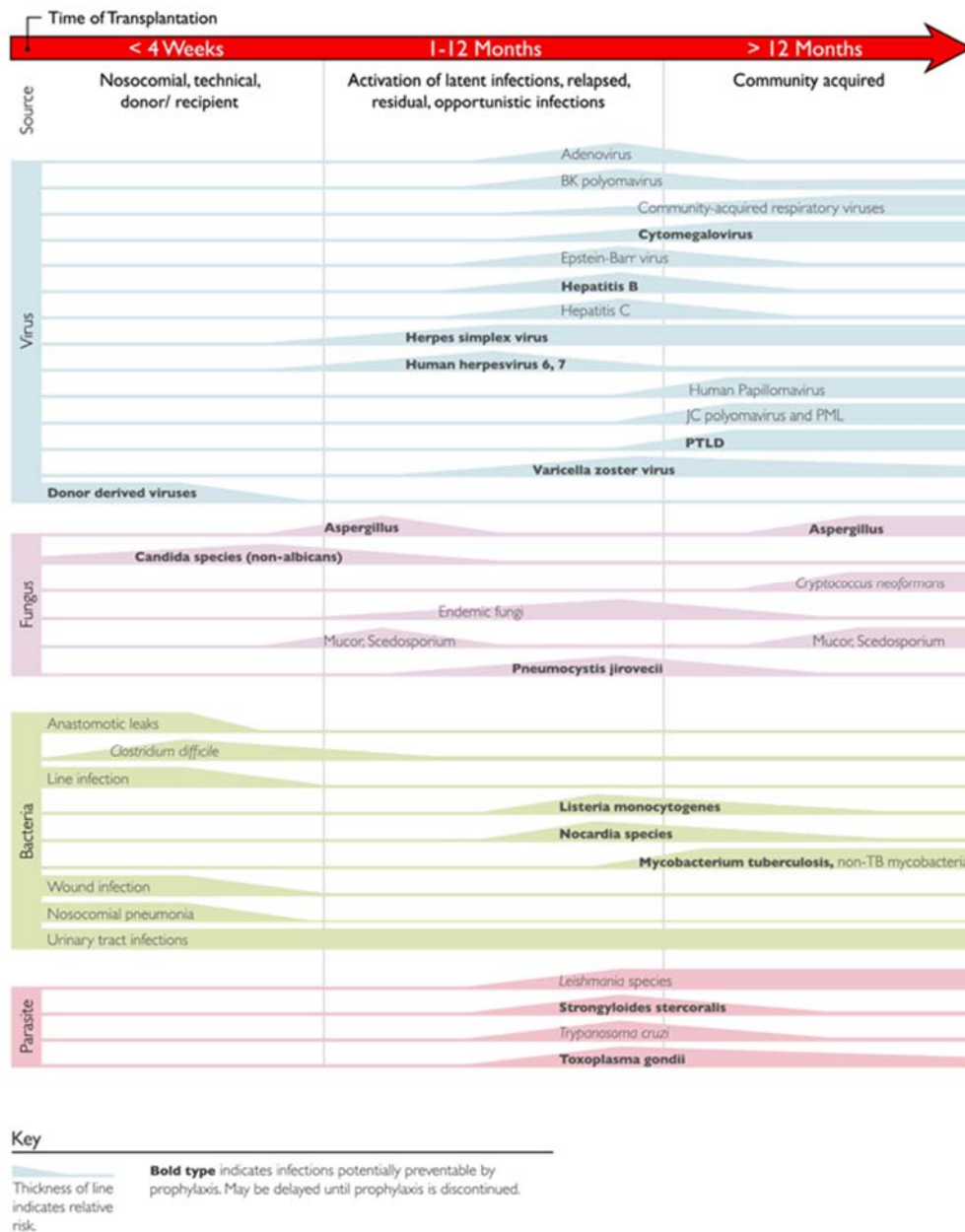


Figura 5. Cronología de las infecciones más comunes durante el post-trasplante. Adaptado de (48)

- Periodo 1: abarca el primer mes post-trasplante, durante el cual las infecciones más comunes son derivadas de complicaciones durante la cirugía, infecciones

derivadas del donante, infecciones latentes en el receptor o infecciones nosocomiales debido a la exposición en el ambiente hospitalario. Todas ellas están muy relacionadas con los altos niveles de inmunosupresión que necesitan los receptores para permitir la aceptación del injerto (50).

- Periodo 2: comprende desde el mes 1 hasta el mes 12 post-trasplante. Durante este periodo, los diagnósticos más comunes son: rechazo del injerto, infecciones derivadas de la herida quirúrgica, neumonías residuales, infecciones víricas como citomegalovirus (CMV) o herpes, así como virus respiratorios adquiridos en el ambiente del paciente, pero además infecciones oportunistas, muy asociadas con la inmunosupresión.
- Periodo 3: abarca más allá del año post-trasplante. Este periodo se caracteriza por funciones renales satisfactorias que permiten la reducción de las pautas de inmunosupresión, junto a un riesgo elevado de exposiciones epidemiológicas asociadas a la comunidad en la que viva el receptor (51).

Cáncer

El riesgo de desarrollar tumores *de novo* en pacientes trasplantados es muy superior al de la población general. La incidencia acumulada de cánceres sólidos en los primeros cinco años post-trasplante es del 4-5%, a diez años post-trasplante incrementa al 10% y pacientes trasplantados hace más de veinte años tienen un riesgo de desarrollar cáncer superior al 25% (52, 53). Comparado con la población general, el mayor incremento de incidencia se ha observado en sarcoma de Kaposi, cánceres de piel no melanomas, cáncer de labio y canceres asociados a virus oncogénicos, como las

enfermedades linfoproliferativas y los cánceres rectales y genitales (54). En contraposición, otros tumores como cáncer de próstata o de mama no muestran riesgos superiores en pacientes trasplantados, en comparación a población general (55).

Los factores que incrementan el riesgo de desarrollar cáncer *de novo* tras el trasplante son: (a) edad, se ha observado que es más probable la aparición de tumores en pacientes trasplantados de mayor edad (56); (b) los trasplantados varones tienen un 20-30% mayor riesgo que las mujeres (57); (c) los pacientes de etnia blanca tienen un 20-35% riesgo superior que el resto (56); (d) la causa de la ERCA, por ejemplo los pacientes con diabetes mellitus tienen un riesgo superior de desarrollar ciertos tipos de tumores (58); y (e) la inmunosupresión, mayores niveles de fármacos inmunosupresores se asocia con mayor riesgo de desarrollar cáncer (59).

Los cánceres que ocurren en pacientes trasplantados renales pueden clasificarse en tres grupos (60). El primer grupo se debería a recidiva de lo que causó la ERCA, que incluyen mielomas y cánceres renales (61). El segundo grupo incluye aquellos en los que el riesgo aumentado de tumores se asocia con la inmunosupresión crónica y con virus oncogénicos. La hipótesis entorno a este grupo es que la inmunosupresión impide los mecanismos de inmunovigilancia, permitiendo el crecimiento descontrolado de las células tumorales (62). El último grupo estaría caracterizado por la aparición de tumores que no presentan una mayor incidencia en pacientes trasplantados, como el cáncer de mama o de próstata (63).

Las guías clínicas para pacientes trasplantados renales recomiendan que se utilicen los test de cribado que se utilizan en la población normal para detectar los tumores

precozmente (64). Sin embargo, se ha observado que la calidad y la consistencia de estas técnicas en población trasplantada fallan en efectividad y en eficacia (65).

Seguimiento post-trasplante y biomarcadores

El principal objetivo del trasplante renal es conseguir la supervivencia tanto del paciente como del injerto a largo plazo, pero hay múltiples factores que pueden interferir. Un seguimiento exhaustivo de los pacientes, así como de la función del injerto, se hace esencial para implementar aproximaciones terapéuticas o ajustes a su pauta terapéutica actual para evitar el fallo del injerto o la muerte del paciente.

En la práctica clínica, el *gold standard* para analizar la función del injerto renal es la creatinina sérica. Elevaciones por encima del 25% de los valores anteriores es un indicador de pérdida de función del injerto. Sin embargo, este incremento no siempre indica un fallo original de la función del injerto, ya que puede ocurrir cuando existe nefrotoxicidad, infecciones y otros eventos (66).

En algunos hospitales, se realizan biopsias de protocolo para determinar cambios histológicos en el injerto que puedan ofrecer información sobre el estado del órgano trasplantado. Sin embargo, se trata de una técnica invasiva que aumenta el riesgo de hematuria, anuria, hematomas, sangrado e incluso shock (67), por lo que no todos los equipos clínicos las realizan.

Tanto los niveles aumentados de creatinina sérica como los cambios histopatológicos en el injerto renal indican un deterioro crónico, que la mayoría de las veces, se trata de daños irreversibles sobre los cuales las terapias preventivas no tendrían ningún efecto y el desenlace del paciente es la pérdida del injerto y la vuelta a diálisis. Esto hace necesario la búsqueda de nuevos biomarcadores que identifiquen precozmente el deterioro del injerto renal, cuando terapias preventivas todavía son eficaces y su implantación mejoraría la supervivencia del injerto y del paciente trasplantado (Figura 6).

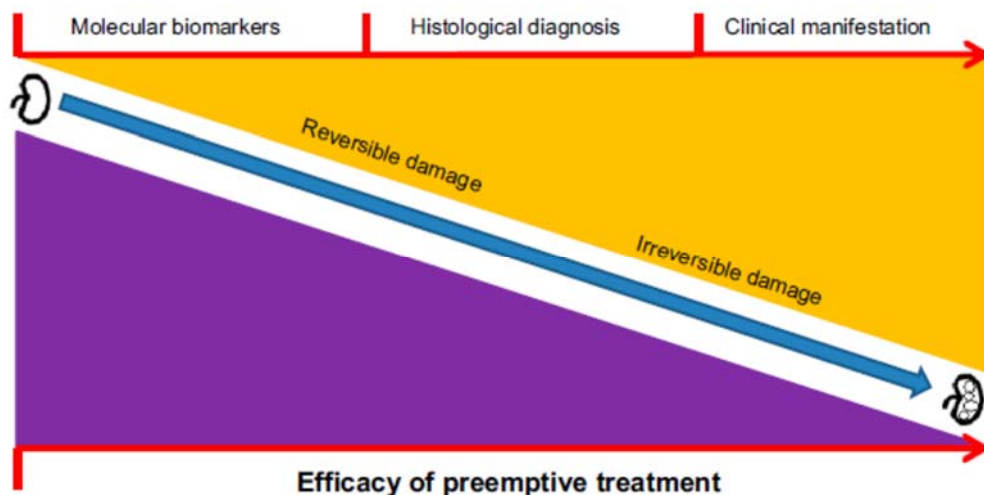


Figura 6. Esquema del progreso del daño renal, las técnicas diagnósticas y eficacia de las terapias preventivas. Adaptado de (68).

Un biomarcador se define como una característica que es analizada y evaluada objetivamente como un indicador de un proceso biológico normal, patológico o en respuesta a fármacos (69). Las características de un biomarcador ideal en el trasplante renal deberían incluir elevadas sensibilidad y especificidad para monitorizar la función

del injerto, independencia de factores de confusión, que no fuera invasivo y que fuera rápidamente medible e interpretable (68).

Los biomarcadores más utilizados en trasplante renal son los anticuerpos HLA y el C4d. La aparición de anticuerpos anti-HLA, especialmente si se trata de anticuerpos donante-específicos, se evalúa de forma rutinaria en el pre-trasplante, para así evitar trasplantar en receptores que poseen repuesta humoral frente a su donante. Su detección en el post-trasplante se asocia con deterioro del injerto renal (70). Además, otros anticuerpos no anti-HLA, como los anticuerpos anti-MICA o anti-células endoteliales también se han asociado con deterioro de la función del injerto (71, 72). El C4d es un factor del complemento que se relaciona con rechazos agudos de los injertos renales de etiología humoral, normalmente asociados a anticuerpos anti-HLA, de mayor severidad que los mediados por células, resistentes a terapias y causantes de daño endotelial y vasculitis. Aparece en las biopsias renales en forma de depósitos en los capilares peritubulares, y estos depósitos se han asociado con daño crónico del injerto (73, 74).

Algunas nuevas aproximaciones surgieron en torno a la búsqueda de nuevos biomarcadores. Por ejemplo, el análisis de quimioquinas en suero y en orina, como CXCL9 o CXCL10, ha mostrado buenos resultados a la hora de predecir el rechazo del injerto. Sin embargo, ya antes del trasplante algunos pacientes mostraron niveles por encima de que lo que se considera riesgo. Otros estudios han mostrado que el análisis de micro ARN (miRNA) individuales, como miR182-5p y miR-21-3p, y un conjunto de ellos en el suero o en orina podría predecir el retraso en la función del injerto; pero esta tecnología tiene el inconveniente del elevado coste asociado (75). Ninguno de estos estudios ha buscado biomarcadores dentro del sistema inmunológico, cuando tiene un

papel muy importante en el rechazo del injerto y en muchas complicaciones post-trasplante.

Poblaciones celulares del sistema inmunológico relevantes en la respuesta al trasplante renal

Dentro del sistema inmunológico, han surgido muchas subpoblaciones minoritarias con importantes funciones inmunomoduladoras sobre las respuestas inmunológicas. Dada su importancia en algunas patologías, su papel en el trasplante renal podría ser determinante tanto en la tolerancia del injerto como en la aparición de diferentes complicaciones post-trasplante. Estas poblaciones: las células supresoras de estirpe mieloide, células T cooperadoras foliculares y las células B reguladoras.

Células supresoras de estirpe mieloide (*Myeloid derived suppressor cells*, MDSC)

Definición, fenotipo y función

En la década de los 70 y de los 80 surgieron algunos estudios que identificaban una población mieloide derivada de células de médula ósea que infiltraban los tumores sólidos y que exhibían potentes capacidades inmunosupresoras sobre los linfocitos T activados *in vitro*. Además, se observó que esa capacidad inmunosupresora estaba relacionada con el tamaño tumoral, de tal manera que a mayor volumen mayor era la inmunosupresión ejercida sobre los linfocitos T (76-78). En los 90 estas células se denominaron células mieloides inmaduras (*immature myeloid cells*, IMC) y/o células mieloides supresoras (*myeloid suppressor cells*, MSC), y hubo una acumulación de estudios que mostraban células mieloides con fenotipos alterados tanto en circulación como en el microambiente tumoral (79-84). En esa misma época, se demostró que una

terapia dirigida a la eliminación de estas células mieloides aberrantes podría ser una aproximación terapéutica viable para el tratamiento del cáncer (85). En 2007, un grupo de expertos unificó todo el conocimiento generado en torno a esta población celular y se propuso el término “*Myeloid-derived suppressor cells*” (Células supresoras de estirpe mieloide, MDSC) para referirse a ellas (86).

En el ámbito de las respuestas defensivas, la activación de las células mieloides se origina tras la interacción de *toll-like receptors* (TLR) con sus ligandos, los patrones moleculares asociados a daño (*damage associated molecular patterns*, DAMP) y los patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) (87). Estas señales originan una rápida movilización de los monocitos y los neutrófilos desde la médula ósea, y se acompaña de un aumento de la capacidad fagocítica, de la producción de citoquinas pro-inflamatorias y de un incremento de la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (*major histocompatibility complex*, MHC) de clase II y de moléculas co-estimuladoras (88, 89). Habitualmente, esta respuesta tiene una duración relativamente corta y finaliza con la eliminación del patógeno. Sin embargo, cuando se genera una inflamación en la que no se elimina la amenaza, como en infecciones persistentes, cáncer y otras condiciones crónicas, existe una persistencia de estas señales de forma más débil pero de larga duración, que a menudo implica factores de crecimiento y mediadores de inflamación (90, 91). Ante estas condiciones se generan monocitos y neutrófilos con un fenotipo y una morfología más inmadura, con menor actividad fagocítica, con una mayor capacidad de producción de especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) y de óxido nítrico, alta expresión de arginasa y prostaglandina E2 (PGE2), así como altos niveles de citoquinas anti-inflamatorias (92, 93). Este estado, que inhibe la inmunidad adaptativa e impide

que se elimine la amenaza, puede considerarse como una condición patológica y las células mieloides que participan en ella pueden ser identificadas como MDSC. Más recientemente se ha observado que la expansión de las MDSC puede no estar limitada a la médula ósea y puede tener lugar en órganos periféricos o incluso en el microambiente tumoral (78, 94).

Por lo tanto, las MDSC se definieron como una población heterogénea de células mieloides inmaduras con funciones inmunosupresoras sobre los linfocitos T, que se acumulan en situaciones crónicas prolongadas (95, 96). Las MDSC pueden ser identificadas en ratón como células CD11b⁺Gr-1⁺ y en humano como CD11b⁺CD33⁺HLA-DR^{low/-} (Tabla 1).

Tabla 1. Identificación fenotípica de MDSC totales y de sus subpoblaciones en ratón y en humano.

Subpoblación	Marcadores en ratón	Marcadores en humano
MDSC totales	Gr-1 ⁺ CD11b ⁺	CD11b ⁺ CD33 ⁺ HLA-DR ^{-/low}
PMN-MDSC	Ly6C ^{low} Ly6G ⁺	CD14 ⁻ CD15 ⁺ CD66b ⁺
M-MDSC	Ly6C ^{high} Ly6G ⁻	CD14 ⁺ CD15 ⁻ CD66b ⁻
eMDSC	Indeterminado	CD14 ⁻ CD15 ⁻ CD66b ⁻

El estudio de las MDSC es todavía limitado y sigue siendo complicado distinguirlas de los monocitos y los neutrófilos. Por este motivo, expertos en el área han postulado que la demostración de su función inmunosupresora *in vitro* fuese un requisito indispensable para su identificación (97-99).

La generación de MDSC se ha dividido en dos procesos: (1) la expansión y (2) la activación (95). La expansión ocurre a partir de señales que involucran el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos (*granulocyte colony-stimulating factor*, G-CSF) y factor estimulador de colonias de macrófagos (*macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF) que promueven la diferenciación de los precursores de monocitos-granulocitos vía activación del transductor de señal y activador de transcripción 3 (STAT3), del complejo de regulación de *CCAAT-enhancer-binding protein a* (C/EBPa), C/EBPb y el factor de regulación de interferón 8 (IRF8) (100, 101). El segundo proceso, de activación, involucra las vías de señalización mediadas por STAT1, STAT6 y el factor nuclear KB (NF- κ B) a través de IFN γ , TNF α , IL13, IL4, TGF β , PGE2, proteínas S100A8/9 y HMGB1 (95, 102). Estas señales conducen a la síntesis de moléculas implicadas en la función inmunosupresora de las MDSC, que incluyen: la sintasa inducible de óxido nítrico (NO) (iNOS), cuya función es convertir L-arginina en NO, molécula que imposibilita la proliferación de los linfocitos T e induce apoptosis (103, 104); la arginasa, una enzima que hidroliza arginina en ornitina y urea, lo que inhibe la proliferación de los linfocitos T por falta de nutrientes (105); la producción de ROS (106); la indoleamin-2,3-Dioxygenasa (IDO), que cataboliza el triptófano, aminoácido esencial para la función de los linfocitos T, causando anergia celular (107); y la IL10, una de las principales citoquinas anti-inflamatorias que además induce la diferenciación de las células T *naïve* a células T reguladoras (108) (Figura 7).

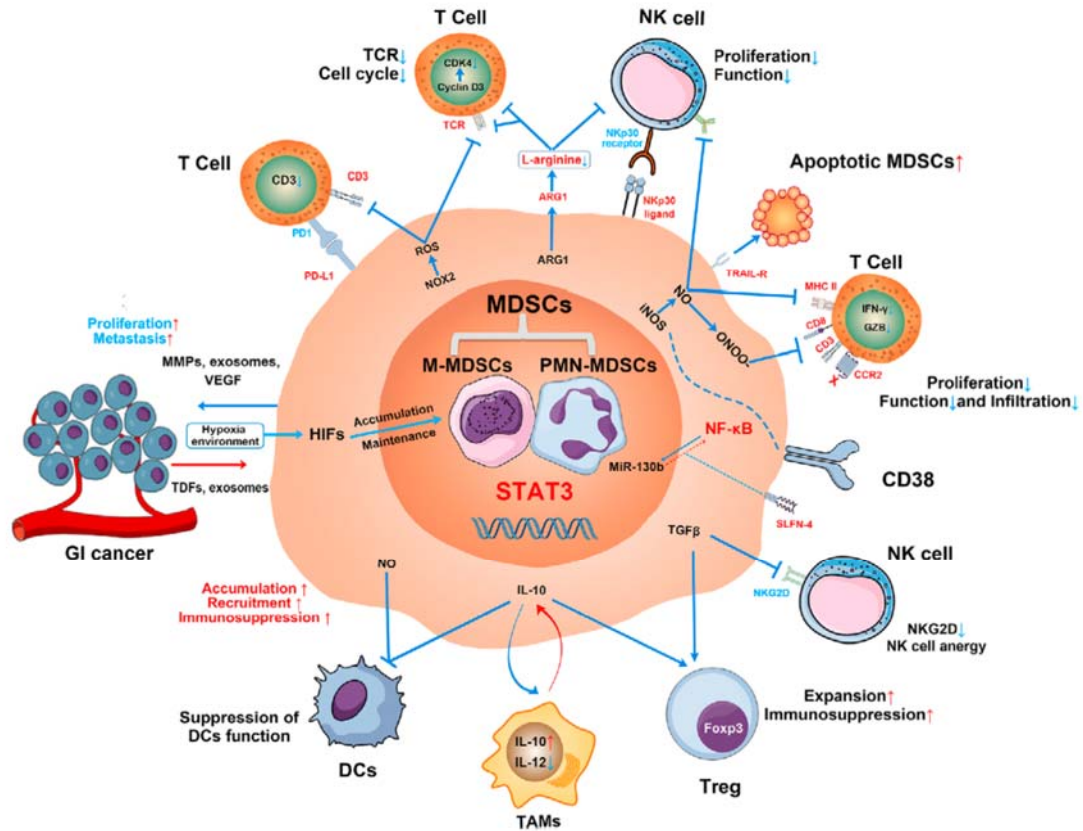


Figura 7. Mecanismos por los que las MDSC inhiben la respuesta inmunológica y rutas involucradas en su función inmunosupresora. Adaptado de (109)

Las MDSC comprenden dos subpoblaciones principales: las MDSC monocíticas (M-MDSC) y las MDSC granulocíticas o polimorfonucleares (G- o PMN-MDSC). Las M-MDSC son fenotípica y morfológicamente similares a los monocitos, mientras que las PMN-MDSC son más similares a los neutrófilos. Las M-MDSC pueden identificarse en ratón gracias a los marcadores Ly6G⁻Ly6C^{high} y en humanos como células CD14⁺CD15⁻, pero además expresan otros marcadores como CD115, CCR2 y VLA4 (110); y se diferencian de los macrófagos y las células dendríticas debido a la falta de expresión de marcadores como CD11c y MHC de clase II (HLA-DR) (111, 112). En cambio, las PMN-MDSC pueden

identificarse en ratón como células Ly6G⁺Ly6C^{low} y en humanos como CD14⁻CD15⁺CD66b⁺, aunque recientemente se ha identificado un nuevo marcador que permite diferenciar a los PMN-MDSC de los neutrófilos, el receptor tipo lectina 1 de LDL oxidado (*lectin-type oxidized LDL receptor 1, LOX-1*) (113). Posteriores estudios en humanos demostraron la existencia de una tercera población de MDSC, formada por células con actividad formadora de colonias y de otros precursores mieloides.

Tabla 2. Funciones inmunosupresoras de las subpoblaciones de MDSC.

Humano			
MDSC	PMN-MDSC	M-MDSC	eMDSC
ROS	+++	-/+	N/A
NO	+	+++	N/A
Arginasa 1	++	+	N/A
IDO	-	++	N/A
PGE2	++	+	N/A
S100A8/A9	++	+	N/A
Treg	-	++	N/A
Ratón			
MDSC	PMN-MDSC	M-MDSC	eMDSC
ROS	++	-/+	
NO	+	++	
Arginasa 1	++	++	
IDO	-	++	
PGE2	++	+	
S100A8/A9	++	+	
Treg	-	++	

Actualmente estas células se denominan MDSC en estadio temprano de diferenciación (*early stage MDSC*, eMDSC) (114), y se identifican en humanos como células linaje-negativas (CD3⁻, CD19⁻, CD56⁻), CD14⁻CD15⁻ (99), mientras que en ratón aún no se ha establecido la forma de identificarlas (Tabla 1).

PMN-MDSC y M-MDSC utilizan diferentes mecanismos para suprimir la respuesta inmunológica y algunos de los mediadores de supresión pueden ser utilizados para distinguir MDSC de neutrófilos y monocitos. Se considera que las M-MDSC poseen unas funciones inmunosupresoras más potentes que las PMN-MDSC (115, 116). Los mecanismos de inmunosupresión mediados por ROS, arginasa 1 y PGE2 se han asociado en mayor medida a las PMN-MDSC; mientras que los mediados por NO e IDO (117), así como la inducción de células T y B reguladoras se han asociado con M-MDSC (118, 119) (Tabla 2). Los mecanismos inmunosupresores de las eMDSC aún no han sido dilucidados y se encuentran en estudio.

Papel de las MDSC en patología

En pacientes con tumores, la acumulación de MDSC promueve la angiogénesis y el crecimiento tumoral así como la metástasis (120) y son pronóstico de desenlace fatal en pacientes con tumores de cabeza y cuello o de hígado (121, 122), entre otros. Incluso se ha postulado que las MDSC son unas células que se acumulan en los nichos pre-metastásicos para condicionar el ambiente para el desarrollo tumoral incluso antes de que se haya formado el tumor (120). Por lo tanto, estrategias que aborden su eliminación podrían suponer una nueva línea de tratamiento. Debido a sus capacidades inmunosupresoras y de inhibición de las respuestas inmunitarias defensivas, en línea

con los resultados observados en pacientes con infecciones y cáncer, se ha considerado a las MDSC como unas “células malas”. Sin embargo, su papel regulador parece crucial para limitar la inflamación y parar las respuestas inmunológicas en general, para que la reparación tisular pueda tener lugar. Así, su habilidad para inhibir la función de los linfocitos T podría tener enormes aplicaciones en la prevención del desarrollo o contención de la progresión de enfermedades autoinmunes o del rechazo inmunológico del injerto en pacientes trasplantados.

En modelos animales de trasplante de piel (123), de corazón (124), de islotes pancreáticos (101), de córnea (125) y de riñón (126, 127) se ha observado, en los receptores, una expansión de células mieloides con capacidad supresora *in vitro*, que concuerda con MDSC. Una mayor acumulación o la inoculación adicional de MDSC se asociaron con mayor supervivencia del injerto, lo que sugiere que estas células tienen un papel importante favoreciendo la tolerancia.

En humanos, el número de estudios que abordan el papel de las MDSC en el trasplante es mucho más limitado. Inicialmente, se observó que los pacientes que habían recibido un trasplante renal tenían niveles elevados de MDSC, similares a los niveles encontrados en pacientes con carcinoma cutáneo de células escamosas (128). En un estudio prospectivo en 29 receptores de un trasplante renal observaron una expansión de MDSC post-trasplante, con niveles significativamente elevados a los 3, 6 y 12 meses. Además estas MDSC inhibieron la función de los linfocitos T *in vitro* y fueron capaces de inducir linfocitos T reguladores (Treg), poniendo de manifiesto que también en humanos las MDSC podrían tener un papel en la evolución del injerto (129). En otro estudio de 50 receptores de un trasplante renal, dividieron a los pacientes en aquellos con niveles altos y bajos de MDSC (> y <10% en PBMC) y concluyeron que los pacientes con niveles

altos mostraban mejor función del aloinjerto post-trasplante (130). Posteriormente, en otro estudio prospectivo que incluyó 8 pacientes receptores de un trasplante renal, identificaron M- y G-MDSC. Desde el primer día tras el trasplante, los pacientes mostraron aumentos muy significativos de las M- y G-MDSC en sangre periférica en comparación a los niveles pre-trasplante (131). En 30 pacientes trasplantados con más de 10 años de función renal estable y con dosis bajas de drogas inmunosupresoras, se observó que las MDSC seguían significativamente elevadas en comparación a los controles sanos y a pacientes con función deteriorada (132).

Todos estos estudios ponen de manifiesto el importante papel que podrían tener las MDSC favoreciendo la tolerancia del injerto a corto y largo plazo. Sin embargo, todos ellos se basan en un número reducido de pacientes y no han reportado asociaciones significativas directas entre las MDSC y las complicaciones post-trasplante, como rechazo agudo del injerto o cáncer.

Células T cooperadoras foliculares

Definición y funciones

Dentro del compartimento adaptativo del sistema inmunológico, los linfocitos T se dividen en dos subpoblaciones de acuerdo a sus funciones efectoras: los linfocitos T CD8⁺, con funciones principalmente citotóxicas; y los linfocitos T CD4⁺, con funciones principalmente cooperadoras. En el grupo de linfocitos cooperadores, las células *naïve* pueden activar diferentes programas de diferenciación para desarrollar diversas funciones orientadas a la eliminación del patógeno. La activación de dichos programas depende del contacto antigénico y de las segundas señales que reciban las células. Entre esos programas de diferenciación principalmente encontramos: linfocitos T

cooperadores 1 (Th1), Th2, Th17, Treg y Tfh (Tabla 3). Tanto las segundas señales inductoras como los factores de transcripción *master* son las guías que permiten a los linfocitos alcanzar las funciones necesarias para la eliminación del patógeno. Si un programa de diferenciación es inducido, el resto quedan inhibidos.

Tabla 3. Subpoblaciones principales de linfocitos T CD4⁺.

Programa	Segunda señal	Factor de transcripción	Funciones	Ref
Th1	IL12	T-bet	Eliminar patógenos intracelulares.	(133)
Th2	IL4	GATA-3	Eliminar helmintos y alérgenos.	(133)
Th17	IL1b, IL23, IL6	RORgt	Eliminar bacterias extracelulares y hongos.	(134)
Treg	TGFβ	FOXP3	Parar las respuestas inmunes y reducir la inflamación.	(135)
Tfh	Varias señales	Bcl6	Cooperación para la síntesis de anticuerpos específicos.	(136)

De entre estos programas celulares, las células Tfh son las principales encargadas de dirigir la generación de anticuerpos específicos del insulto mediante la cooperación con los linfocitos B. La diferenciación de los programas Th1, Th2, Th17 y Treg es inducida en su totalidad por una segunda señal, en cambio la diferenciación y activación de las Tfh es un proceso con 3 etapas y varias señales.

El proceso de diferenciación a Tfh comienza con la presentación antigénica por parte de una célula mieloide al linfocito T CD4 *naïve* (137) y está regulado por segundas señales. La IL6 es la principal segunda señal, pero también participan otras proteínas como el co-estimulador inducible (ICOS), IL2 e IL21 (138). Estas señales inducen la expresión del factor de transcripción *master* para la diferenciación a Tfh, Bcl6, que es a su vez necesario para la expresión de CXCR5 (139). Gracias a la expresión de CXCR5 las Tfh pueden migrar a las zonas B de los folículos de los nódulos linfáticos o del bazo, donde se inicia la segunda etapa de la diferenciación a Tfh. Las células B actúan como células presentadoras de antígeno y ofrecen co-estimulación a través del ligando de ICOS (ICOSL) (140). La última etapa tiene lugar en los centros germinales, donde las Tfh incrementan la expresión de los receptores de quimioquinas CXCR5 y CXCR4, así como de las moléculas de adhesión CD84 y molécula de activación de señalización linfocitaria (SLAM) u otras, que permiten a las Tfh co-localizar con las células B para proporcionar su ayuda y facilitar su transformación a células B plasmáticas o plasmablastos productores de anticuerpos (141). Tras desarrollar su función, los linfocitos Tfh pueden permanecer en el mismo folículo, migrar a otro folículo vecino o dejar de expresar Bcl6, adoptar un fenotipo memoria y recircular (142). Estas células que recirculan se han denominado Tfh circulantes (cTfh) (Figura 8).

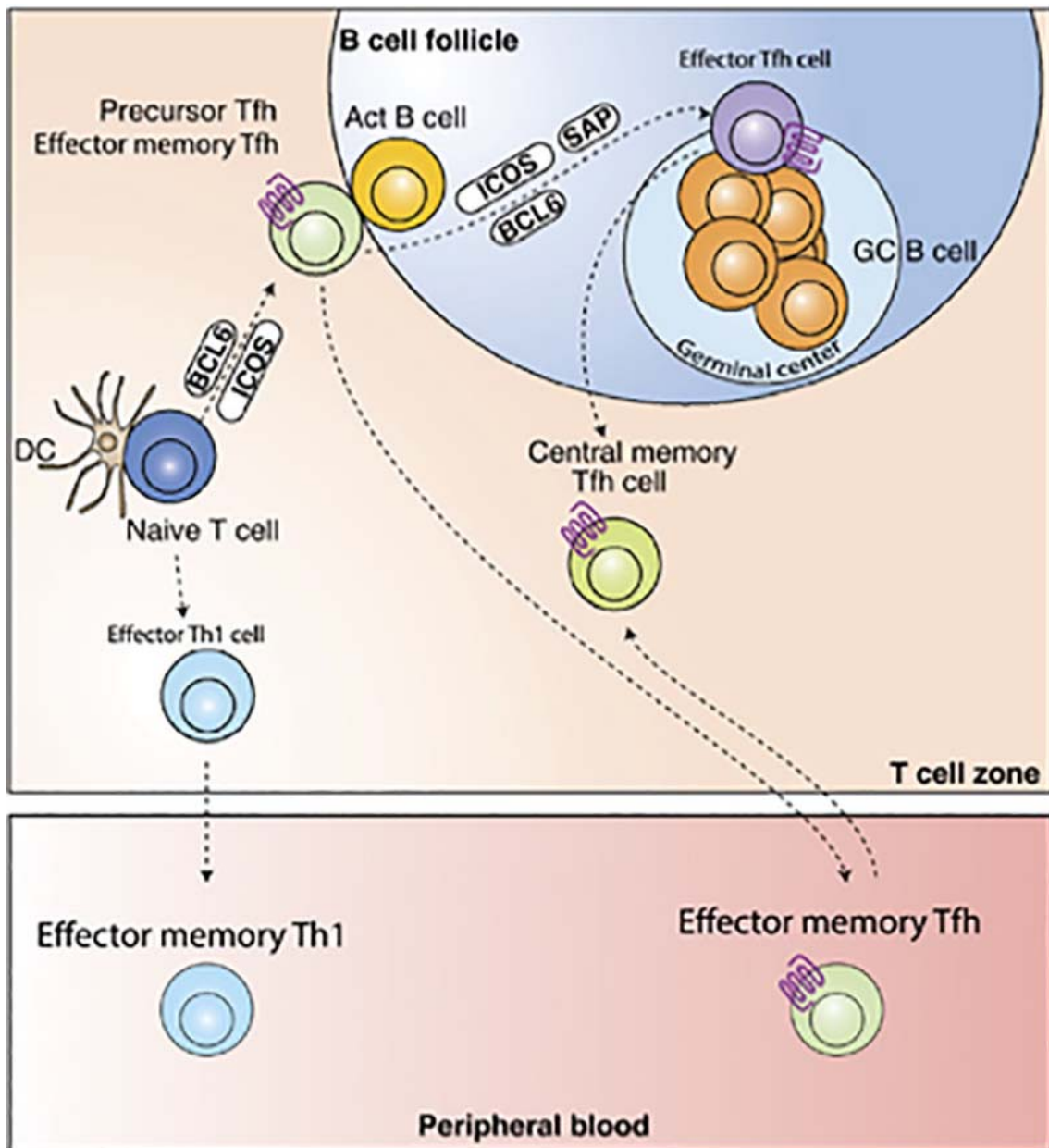


Figura 8. Diferenciación y activación de las Tfh. Los linfocitos T naïve contactan con una célula presentadora de antígenos y gracias a la co-estimulación con ICOS-ICOSL, el linfocito empieza a expresar Bcl6. El precursor de Tfh viaja a un folículo B gracias a la expresión de CXCR5. Contacta con la célula B y gracias a las segundas señales, el precursor Tfh se diferencia a Tfh efectora. Cuando estas Tfh terminan su función pueden dejar el folículo y circular en periferia, denominándose Tfh circulantes. Adaptado de (143).

Las cTfh muestran un fenotipo caracterizado por la expresión de CXCR5 y proteína inductora de muerte celular programada 1 (PD-1) y la falta de expresión de CCR7 y cuando son re-estimuladas tienen la capacidad de inducir respuestas humorales, al igual que las Tfh de centros germinales (144, 145). Por estos motivos se considera que su monitorización podría ser útil como biomarcador en respuesta a infecciones o vacunas, en enfermedades autoinmunes o en trasplantes.

Papel de las cTfh en trasplante renal

Una de las principales causas de pérdida del injerto en pacientes trasplantados renales es el rechazo agudo mediado por el sistema inmunológico, siendo más común que ocurra si los rechazos son mediados por anticuerpos (146). Las cTfh podrían tener un papel importante en el rechazo agudo humoral. En 42 pacientes trasplantados renales, se analizaron las cTfh entre 1 y 3 años post-trasplante y se observaron mayores niveles de cTfh en aquellos pacientes que estaban desarrollando rechazo crónico del injerto (147). En un estudio prospectivo en pacientes trasplantados renales, no observaron diferencias en los números absolutos de cTfh pero sí en su capacidad de producir IL21. Lo más importante de este estudio es que en las biopsias de pacientes que experimentaban rechazo agudo del injerto había altos niveles de cTfh en estructuras similares a folículos linfoides en los injertos (148). En pacientes con tolerancia operacional se observó que si bien los niveles de cTfh eran similares a los de controles sanos, en esos pacientes las cTfh eran incapaces de inducir la producción de IgG por las células B (149). Estos estudios indican que las cTfh podrían tener un papel importante en el rechazo del injerto, sin embargo se basan en un reducido número de pacientes y

no han encontrado asociación directa con el rechazo. Tampoco sabemos cómo las actuales pautas de inmunosupresión afectan a esta subpoblación celular. Nuestro grupo de investigación realizó un estudio prospectivo en 206 pacientes receptores de un trasplante renal. Los resultados del estudio demostraron que: (1) las cTfh pre- y post-trasplante tenían capacidad de derivar células B a plasmablastos, aunque post-trasplante esta capacidad se vio significativamente reducida en comparación a la de controles sanos; (2) las cTfh estaban aumentadas pre-trasplante en aquellos pacientes que habían tenido episodios de sensibilización previos, como trasplantes previos o transfusiones sanguíneas; (3) la terapia de inducción con timoglobulina depleciona muy significativamente las cTfh y no se recuperan a niveles similares al pre-trasplante hasta 6 meses post-trasplante; (4) los niveles de cTfh correlacionaron significativamente con la aparición de anticuerpos anti-HLA *de novo* en el post-trasplante; y (5) el rechazo agudo diagnosticado por biopsia fue mucho más probable en aquellos pacientes que tenían niveles altos de cTfh en el pre-trasplante (150).

A pesar de estos avances, la relación de las cTfh con las poblaciones B en pacientes trasplantados renales aún no se ha estudiado en profundidad y dada su relación funcional podría tener mucho interés y podría ofrecer mejores herramientas para la monitorización y la predicción de eventos post-trasplante.

Células B reguladoras

Definición y origen

Dentro del compartimento adaptativo del sistema inmunológico, las células B son las encargadas de la respuesta humoral o producción de anticuerpos específicos, pero

además participan en la presentación antigénica a los linfocitos T y secretan varias citoquinas.

El desarrollo de las células B se inicia en el hígado fetal y continúa tras el nacimiento en la médula ósea, donde varios puntos de control aseguran que las células B que salgan a periferia expresen BCRs funcionales y que no reconozcan auto-antígenos. Las células B inmaduras que salen de médula ósea se denominan células B transicionales, expresan la inmunoglobulina (Ig) M y la IgD en su superficie y se caracterizan por la expresión de CD24^{high}CD38^{high} así como por la falta de expresión del marcador de memoria CD27. Estas células completan su desarrollo en periferia, donde la estimulación antigénica permite su diferenciación a plasmablastos, células B plasmáticas y células B memoria (151). La función de las células plasmáticas, de vida larga, alojadas en la médula ósea, y de los plasmablastos, células de vida corta, es la producción de anticuerpos. En cambio, las células B de memoria recirculan hasta que encuentran su antígeno, entonces se diferencian a plasmablastos a través de la interacción con linfocitos T (152).

Además de las subpoblaciones y funciones descritas previamente, se ha observado que un subgrupo de células B tiene funciones inmunosupresoras, y se ha acuñado el término “células B reguladoras” (Breg) para referirse a todas ellas. Hasta ahora no existe un único marcador fenotípico que identifique a todas las células Breg, por lo que el término se refiere a un amplio abanico de células B con diferentes fenotipos que se expanden ante distintos mecanismos, suprimen a las células T y por lo tanto, proporcionan tolerancia inmunológica (153).

La ontogenia de las células Breg permanece aún bajo investigación. Sin embargo, se ha observado que las células Breg pueden surgir a partir de células B convencionales en

diferentes estados de desarrollo y diferenciación, cuando existe el ambiente adecuado (154, 155). La estimulación con CpG puede inducir la diferenciación de células B a plasmablastos productores de IL10, pero cuando esa estimulación se acompaña de IL2, IL6 o IFN α , la producción de IL10 incrementa significativamente (156). En otro estudio observaron que la estimulación con IFN α , IL1 β e IL6 induce la producción de IL10 y la diferenciación hacia célula Breg (155). Además, se ha observado que la producción de IL10 en las células B puede inducirse mediante señalización por TLRs con o sin estimulación del BCR o CD40 (156). Existen otras moléculas como lipopolisacárido (LPS), *Phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA), ionomicina que también contribuyen a la síntesis de IL10 por parte de las células B (157). Las células dendríticas plasmacitoides también tienen un papel importante en la inducción de células B reguladoras, ya que fuerzan la expresión de IL10 en células B induciendo un fenotipo inmunosupresor caracterizado por la expresión de CD25 y ligando de PD-1 (PD-L1) (154, 158). Otros mecanismos involucrados en el control de la diferenciación de las células B a Breg son la activación del receptor de aryl hydrocarbon (*aryl hydrocarbon receptor*, AhR) (159) y el ligando inductor de proliferación (*proliferation-inducing ligand*, APRIL) (160) (Figura 9). Todos estos estudios sugieren que la inducción de las células Breg así como la producción de IL10 están sujetos al reconocimiento antigénico, la unión de CD40 con su ligando y la activación de receptores de reconocimiento de patrones, pero además, que la inducción de Breg productoras de IL10 está también sujeta a la existencia de inflamación.

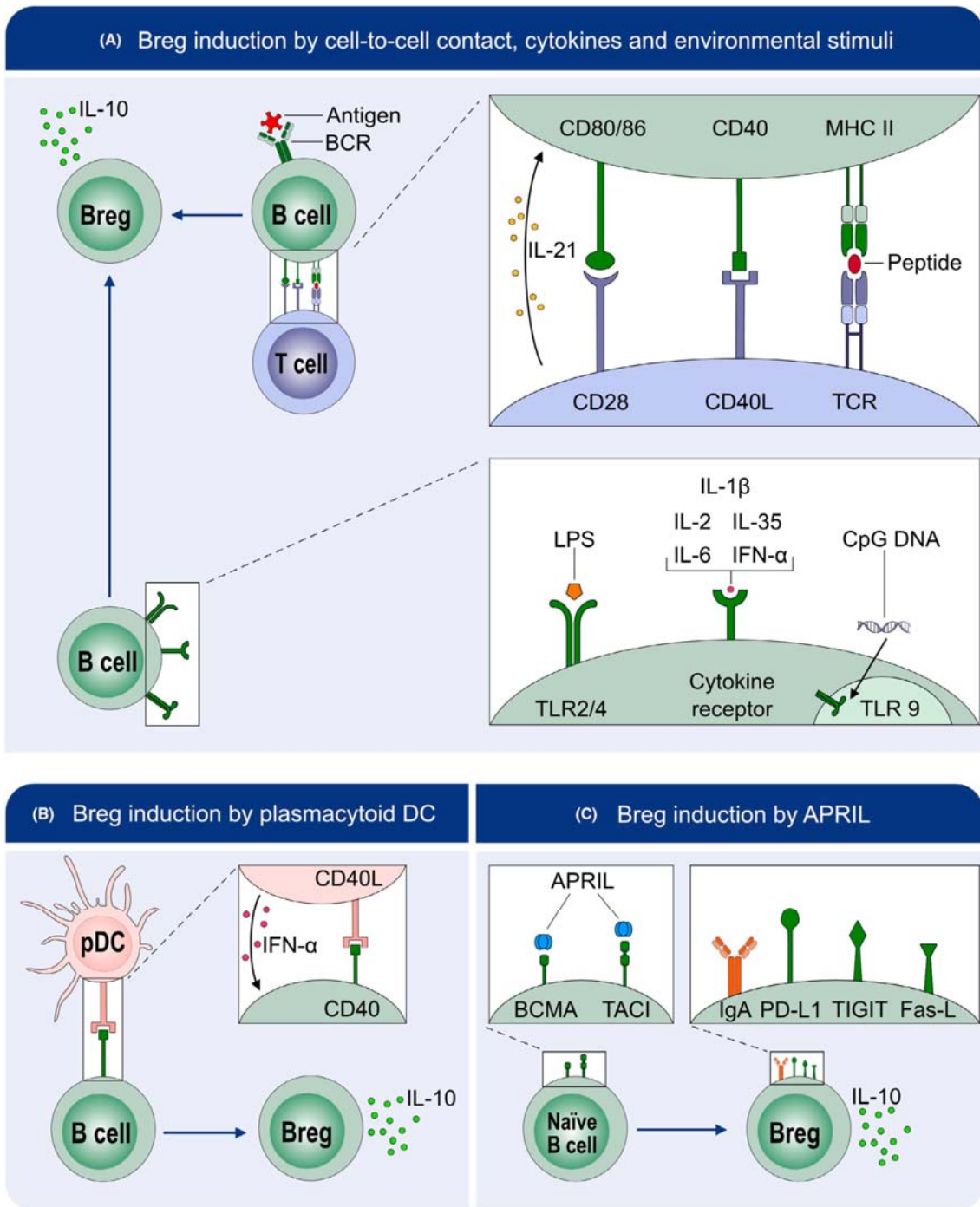


Figure 9. Mecanismos de inducción y desarrollo de células Breg. Las células Breg pueden ser inducidas mediante (A) contacto celular, citoquinas y estímulos del medio; (B) inducción por parte de células dendríticas plasmacitoides; y (c) regulación mediante APRIL. Adaptado de (161)

La función principal de las células Breg es la regulación de la respuesta inmunológica. Para ello, exhiben una amplia gama de mecanismos, bien mediados por factores solubles o por moléculas expresadas en la superficie celular. Entre los factores solubles destaca la IL10, el factor de crecimiento transformante beta (TGF β), la IL35 y la granzima B. La producción de IL10 inhibe la proliferación y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias por parte de los linfocitos T CD4⁺ y además reduce la inflamación en modelos animales de artritis (162, 163), lupus (164), diabetes tipo 1 (165), colitis (166) y encefalitis alérgica experimental (EAE) (167). La producción de IL10 por parte de las células B también induce la diferenciación de linfocitos CD4⁺ *naïve* a Treg (168, 169). Otro factor soluble implicado en la función de las células Breg es el TGF β . Se ha observado que este factor soluble es capaz de inducir la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ *naïve* a Treg (170), así como inducir anergia en los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (171); pero también se ha reportado que podría tener un papel fundamental en el control de los linfocitos T inflamatorios, ya que ratones deficientes en la producción de TGF β 1 en células B desarrollan EAE de forma acelerada en comparación a ratones *wild-type* (172). La IL35 es una citoquina de la familia de la IL12 y se caracteriza por sus potentes capacidades anti-inflamatorias, que incluyen la inhibición de la función antitumoral de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, la inducción de un fenotipo de agotamiento celular y la expansión de Treg (173-175). Se ha observado que la estimulación con LPS e IL35 induce la expansión de células B productoras de IL10 y de IL35 (176, 177). Por último, las células Breg también inhiben las respuestas inflamatorias mediante la liberación de granzima B. Las granzimas son un grupo de serin proteasas citotóxicas que median la apoptosis celular cuando atraviesan el citoplasma gracias a la acción de la perforina. Además la granzima B tiene un papel importante en la remodelación tisular (178).

En cuanto a los mecanismos de supresión mediados por moléculas de membrana, destacan los mecanismos mediados por CD1d, PD-L1, FasL y dominio 1 de mucina y de inmunoglobulina en las células T (TIM-1). Varios estudios han descrito una expresión aumentada de CD1d en la membrana de las células Breg (179, 180). CD1d es una molécula del MHC de clase I cuya función es la de presentar antígenos glucolipídicos a una subpoblación de linfocitos T denominados linfocitos T asesinos naturales (*natural killer T cells*, NKT), caracterizadas por tener un TCR invariante en membrana (181). La población NKT se divide en dos subpoblaciones: las NKT invariantes (iNKT) o de tipo I y las NKT de tipo II, con un TCR más diverso. Se ha observado que, en pacientes con lupus eritematoso sistémico, hay un compartimento B desregulado junto a bajas frecuencias de iNKT; además demostraron que las células B son esenciales para el mantenimiento de las iNKT, población que contribuye al mantenimiento de la tolerancia en enfermedades autoinmunes (182).

PD-1 es una de las moléculas conocidas como *checkpoints* del sistema inmunológico, ya que su función es la de limitar la respuesta inmune y preservar la auto-tolerancia. Tras la interacción con sus ligandos, PD-L1 o PD-L2, se desarrollan señales inhibitoras en la célula que reducen las señales de supervivencia, diferenciación y secreción de citoquinas pro-inflamatorias. Varios estudios han demostrado la expresión de PD-L1 en células B reguladoras. Estas células B expresan IL10 y son capaces de suprimir la función de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, así como inducir la diferenciación hacia Treg (183). Otro estudio demostró que estas células Breg PD-L1⁺ reducen la síntesis de TNF α por parte de los macrófagos y de los linfocitos T, y de esta manera alivian la inflamación relacionada con la EAE (160).

El contacto del receptor Fas con su ligando (FasL) induce el proceso de muerte celular, por ello tiene funciones muy importantes en el mantenimiento de la tolerancia. Se ha observado que células Breg de modelos animales con lupus eritematoso sistémico (184) y en pacientes con diabetes (185) expresan FasL y ayudan a la inducción de apoptosis en linfocitos T CD8⁺ citotóxicos.

Por último, el mecanismo más recientemente descubierto es el mediado por la expresión de TIM-1 por parte de las células Breg. TIM-1 es un receptor que tras el contacto con su ligando induce la liberación de citoquinas anti-inflamatorias por parte de los linfocitos B, así como la expresión de más ligandos asociados a inmunosupresión, sin embargo, en linfocitos T actúa como una señal co-estimuladora que induce la activación y la secreción de IL4 (186). Se ha observado que células Breg que expresan TIM-1 podrían tener un papel importante en el mantenimiento de la tolerancia de los injertos a largo plazo (187, 188) (Figura 10).

En humanos el estudio de las células Breg ha originado la identificación de diferentes subpoblaciones de ellas en función de sus fenotipos diversos y de sus distintas funciones inmunosupresoras (Tabla 4). Principalmente se han identificado 4 subpoblaciones de células B con capacidades supresoras, aunque no han sido las únicas. Se identificó una población de células B que co-expresan CD24 y CD27, lo que sugiere que es una población con un fenotipo memoria, que son capaces de liberar IL10 e inhibir la producción de citoquinas por parte de los monocitos y debido a su similitud con otra población de células B encontradas en ratón, se les ha denominado células B10 (189).

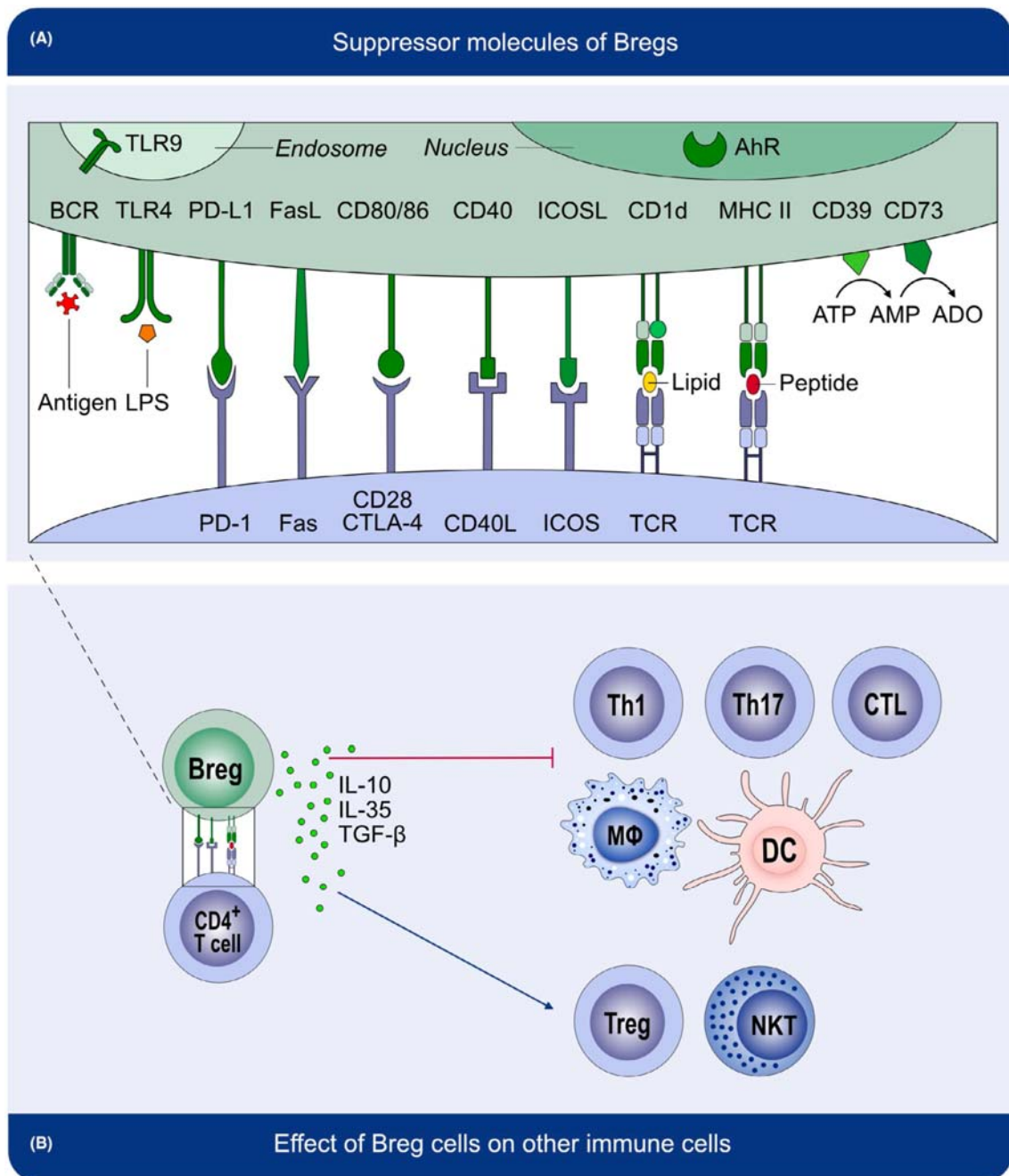


Figure 10. Mecanismos de supresión solubles y contacto dependientes de las células Breg. Adaptado de (161).

Dentro de las células B más inmaduras o transicionales, también se ha encontrado una subpoblación con capacidad de liberar IL-10, pero no TGFβ, sin embargo su función

inmunosupresora fue revertida tras el contacto con CD80 o CD86. Esta población esta disminuida y tiene menos capacidad de liberar IL10 en pacientes con lupus (190). En modelos animales de autoinmunidad, se ha observado que parte de las células productoras de anticuerpos de vida más corta, los plasmablastos, expresan IL10 y tienen funciones supresoras; cuando esta población es deplecionada hay una exacerbación de la enfermedad autoinmune (156) (Tabla 4).

Tabla 4. Funciones y fenotipos de las células Breg en humanos. Adaptado de (192)

Subpoblación	Fenotipo	Funciones	Mediadores
Breg		inmunosupresoras	
Células B10	CD19 ⁺ CD24 ^{high} CD27 ⁺	Suprimen la función de los monocitos	IL10
Células B inmaduras o transicionales	CD19 ⁺ CD24 ^{high} CD38 ^{high}	Suprimen función de los linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ Inducen Treg e iNKT	IL10 PD-L1
Plasmablastos	CD19 ⁺ CD24 ^{high} CD38 ⁺ CD27 ^{int}	Suprimen función de células dendríticas y linfocitos T CD4 ⁺	IL10
Células B Granzima B⁺	CD19 ⁺ CD138 ⁺ CD38 ⁺ CD25 ⁺ CD27 ⁺	Suprime función linfocitos T CD4 ⁺	Granzima B
	CD19 ⁺ CD38 ⁺ CD25 ⁺ CD1d ⁺ CD10 ⁺	Suprime función linfocitos T CD4 ⁺	Granzima B IL10

Papel en el trasplante de órganos

Dada la capacidad de las células Breg de restringir la respuesta inmunológica, su estudio en trasplante renal y su relación con la tolerancia revisten gran interés. En un modelo animal de enfermedad de injerto contra huésped, se observó que aquellos animales con enfermedad crónica tenían niveles muy bajos de células Breg (191). Además, en un modelo de ratón de trasplante de islas pancreáticas, las células Breg se asociaron con tolerancia temprana del injerto (188).

En humanos, la relación entre las células B con la tolerancia del injerto renal se observó por primera vez en pacientes con tolerancia operacional (pacientes trasplantados hace años que dejan de tomar la inmunosupresión y desarrollan tolerancia espontánea del injerto), en los que se encontró una firma transcripcional de genes relacionados con las células B así como un número superior de células B (193). Posteriormente, se demostró que la capacidad para sintetizar IL10 era superior en las células B transicionales que en las células B *naïve* o memoria; pero además la medición del ratio de producción de IL10 sobre la producción de TNF α en células B transicionales era un buen biomarcador de pacientes trasplantados con buena (alta ratio IL10/TNF α) y mala función del injerto (baja ratio IL10/TNF α) (194). En otro estudio prospectivo que incluyó 73 pacientes trasplantados renales, se objetivó que mayores niveles de células B transicionales se asociaba con menor riesgo de rechazo agudo (195). En el primer estudio en el que analizaron la producción intracitoplasmática de IL10 por parte de las células B transicionales de forma prospectiva en 45 trasplantados renales, dividieron a las células B transicionales en células B T1 y T2 en función de la expresión de CD24 y CD38 (T1: CD24^{high}CD38^{high}; T2: CD24⁺CD38⁺), y observaron que la producción de IL10 era

significativamente mayor en las células T1. La ratio T1/T2 surgió como un factor independiente predictor de la disfunción del injerto en los 5 años posteriores. En otra cohorte independiente de 97 pacientes a los dos años tras el trasplante renal, concluyeron que la ratio T1/T2 también identificaba a aquellos pacientes que posteriormente perdían la función del injerto (149). Todos estos datos sugieren que las células B transicionales, y dentro de ellas las que mayor producción de IL10 mostraron, las T1, podrían tener una gran importancia en la tolerancia del injerto y su estudio podría proporcionar biomarcadores que ofrecieran información sobre la evolución del injerto renal a corto y largo plazo.

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

JUSTIFICACION

El trasplante renal es la mejor opción terapéutica para los pacientes con ERCA, ya que no sólo mejora la calidad de vida sino que además alarga considerablemente la supervivencia global de los pacientes. Una de las principales complicaciones del trasplante es el rechazo del injerto mediado por el sistema inmunológico. Los avances en las técnicas quirúrgicas y en las terapias inmunosupresoras han permitido mejorar la implantación y la supervivencia del injerto; a pesar de ello, tanto la tolerancia a largo plazo como las complicaciones post-trasplante siguen suponiendo una barrera importante de la supervivencia del órgano trasplantado.

Los métodos analíticos actuales para el seguimiento del paciente trasplantado proporcionan información valiosa sobre el funcionamiento del injerto, sin embargo algunos de ellos no son específicos, predictivos o suficientemente precoces. Estos métodos detectan variaciones clínicas que reflejan un daño irreversible en el injerto, cuando las terapias preventivas ya no tienen efecto. Por lo tanto, biomarcadores que pudieran predecir de forma precoz las complicaciones post-trasplante serían de gran utilidad e interés clínico.

La pauta inmunosupresora actual va dirigida principalmente a contener la respuesta inmunológica adaptativa, y aun así varias complicaciones post-trasplante siguen siendo relativamente comunes, lo que sugiere que otros tipos celulares distintos de linfocitos T y B, pertenecientes al sistema inmunológico innato, como las células mieloides, podrían estar jugando un papel muy importante en la aceptación o rechazo del injerto. Pero además, en los últimos años han surgido poblaciones celulares minoritarias del sistema inmunológico adaptativo, con potentes capacidades inmuno-moduladoras. Su papel en

el trasplante renal aún no se ha estudiado, ni se conoce qué efecto pueden tener los fármacos inmunosupresores sobre ellas. El análisis de estas poblaciones podría dar lugar a biomarcadores útiles para ciertos eventos post-trasplante.

HIPOTESIS

Dada su naturaleza inmunosupresora, las M-MDSC y las células Breg podrían favorecer la tolerancia del injerto y su análisis podría ayudar a determinar el estado inmunológico en el que se encuentra el paciente y anticipar complicaciones en el post-trasplante.

OBJETIVOS GENERALES

1. Identificación fenotípica y caracterización funcional de las M-MDSC en pacientes receptores de un trasplante renal.
2. Estudiar la dinámica del compartimento mieloide y su relación con complicaciones post-trasplante.
3. Analizar la dinámica del compartimento de células B del sistema inmunológico adaptativo y su implicación en complicaciones post-trasplante.
4. Evaluar la relación de las cTfh y de las IL10⁺Breg pre- y post-trasplante y su asociación con eventos post-trasplante.
5. Estudiar el efecto de las drogas inmunosupresoras de inducción y de mantenimiento sobre las M-MDSC y las IL10⁺Breg.

CAPITULOS

CAPITULO 1: *Early posttransplant mobilization of monocytic myeloid-derived suppressor cell correlates with increase in soluble immunosuppressive factors and predicts cancer in kidney recipients*

Alberto Utrero Rico, Rocío Laguna Goya, Francisco Cano Romero, Marta Chivite Lacaba, Cecilia Gonzalez Cuadrado, Elena Rodriguez Sanchez, Gema Ruiz Hurtado, Antonio Serrano, Mario Fernández Ruiz, Iago Justo, Esther Gonzalez, Amado Andrés, Estela Paz Artal.

Transplantation. 2020 Dec;104(12):2599-2608. doi: 10.1097/TP.0000000000003179.

OBJETIVOS

Además de los linfocitos, las células mieloides tienen un papel muy importante en la respuesta inmune frente al aloinjerto. Recientemente, se ha descrito una población celular dentro del compartimento mieloide que se asemeja a los monocitos pero que muestra baja expresión de HLA-DR, así como potentes funciones inmunosupresoras. Estas células se han denominado M-MDSC. En pacientes con tumores sólidos, las M-MDSC están significativamente aumentadas en sangre periférica y cuando se analizan *in vitro*, muestran potentes capacidades inmunosupresoras sobre linfocitos T CD4 y CD8. Además, se ha observado que son un factor pronóstico del desenlace del paciente, de tal forma que pacientes con altos niveles de M-MDSC circulantes progresan, sufren progresión del tumor, presentan un peor curso de la enfermedad y fallecen antes. Incluso se ha observado que estas células son capaces de colonizar otros tejidos y preparar el microambiente para la migración de las células tumorales y el desarrollo de metástasis. Dadas sus funciones, en el trasplante renal podrían jugar un papel muy importante en la tolerancia del injerto. Las M-MDSC se han descrito en pequeñas cohortes de pacientes receptores de un trasplante renal, pero ningún estudio ha encontrado asociación entre M-MDSC y el rechazo agudo u otras complicaciones post-trasplante.

Con estos antecedentes, nos propusimos analizar de forma prospectiva las M-MDSC en una amplia cohorte de 229 pacientes receptores de un trasplante renal en el pre- y en el post-trasplante. Los objetivos planteados son:

1. Identificar fenotípicamente las M-MDSC en pacientes con ERCA pre- y post-trasplante y evaluar su función inmunosupresora *in vitro*.

2. Analizar el efecto de las terapias inmunosupresoras sobre las M-MDSC.
3. Evaluar la dinámica de las M-MDSC y su relación con complicaciones post-trasplante.
4. Cuantificar factores inmunosupresores asociados con la expansión de las M-MDSC en el suero de los pacientes y estudiar su asociación con los niveles de M-MDSC.

CONCLUSIONES

1. Dentro del compartimento mieloide, tras la cirugía del trasplante renal los monocitos clásicos disminuyen muy significativamente y solamente alcanzan niveles similares al pre-trasplante a partir de los 6 meses post-trasplante. Por el contrario las M-MDSC aumentan muy significativamente tras la cirugía y se mantienen aumentadas durante todo el primer año de seguimiento en comparación al pre-trasplante.
2. Las células mieloides de los pacientes trasplantados a 14 días post-trasplante, que están enriquecidas en células con baja expresión de HLA-DR, inhiben *in vitro* la proliferación de los linfocitos T CD4 y CD8 y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias.
3. Los pacientes trasplantados que desarrollaron cánceres *de novo* mostraron los niveles más altos de M-MDSC durante el primer mes post-trasplante.
4. Niveles superiores a 179.2 células por microlitro de M-MDSC a los 14 días post-trasplante surge como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de cáncer *de novo* en los dos primeros años post-trasplante.
5. Los niveles de M-MDSC post-trasplante correlacionan directamente con los niveles séricos de IL10 y de MMP9 e inversamente con la actividad antioxidante total.

PUBLICACIÓN

Early Posttransplant Mobilization of Monocytic Myeloid-derived Suppressor Cell Correlates With Increase in Soluble Immunosuppressive Factors and Predicts Cancer in Kidney Recipients

Alberto Utrero-Rico, MSc,¹ Rocio Laguna-Goya, MD, PhD,^{1,2} Francisco Cano-Romero, MSc,¹ Marta Chivite-Lacaba, BSc,¹ Cecilia Gonzalez-Cuadrado, MSc,¹ Elena Rodríguez-Sánchez, MSc,⁴ Gema Ruiz-Hurtado, PhD,^{4,5} Antonio Serrano, MD, PhD,^{1,2} Mario Fernández-Ruiz, MD, PhD,^{1,6} Iago Justo, MD, PhD,⁷ Esther González, MD, PhD,⁸ Amado Andrés, MD, PhD,⁸ and Estela Paz-Artal, MD, PhD^{1,2,3}

Background. Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) increase in patients with cancer and are associated with poor prognosis; however, their role in transplantation is not yet understood. Here we aimed to study the MDSC effects on the evolution of kidney transplant recipients (KTRs). **Methods.** A cohort of 229 KTRs was prospectively analyzed. Two myeloid cells subsets. CD11b⁺CD33⁺CD14⁺CD15⁺HLA-DR^{-/low} (monocytic MDSC [M-MDSC]) and CD11b⁺CD33⁺CD14⁺CD15⁻HLA-DR⁺ (monocytes), were defined by flow cytometry. The suppressive capacity of myeloid cells was tested in cocultures with autologous lymphocytes. Suppressive soluble factors, cytokines, anti-HLA antibodies, and total antioxidant capacity were quantified in plasma. **Results.** Pretransplant, M-MDSC, and monocytes were similar in KTRs and healthy volunteers. M-MDSCs increased immediately posttransplantation and suppressed CD4 and CD8 T cells proliferation. M-MDSCs remained high for 1 y posttransplantation. Higher M-MDSC counts at day 14 posttransplant were observed in patients who subsequently developed cancer, and KTRs with higher M-MDSC at day 14 had significantly lower malignancy-free survival. Day 14 M-MDSC >179.2 per microliter conferred 6.98 times (95% confidence interval, 1.28-37.69) more risk to develop cancer, independently from age, gender, and immunosuppression. Early posttransplant M-MDSCs were lower in patients with enhanced alloimmune response as represented by anti-HLA sensitization. M-MDSC counts correlated with higher circulatory suppressive factors arginase-1 and interleukin-10, and lower total antioxidant capacity. **Conclusions.** Early posttransplant mobilization of M-MDSCs predicts cancer and adds risk as an independent factor. M-MDSC may favor an immunosuppressive environment that promotes tumoral development.

(*Transplantation* 2020;104: 2599–2608).

INTRODUCTION

Together with lymphocytes, myeloid cells are considered pivotal players in the immune response against the renal allograft. The myeloid compartment includes HLA-DR

expressing cells (CD33⁺CD11b⁺HLA-DR⁺ cells) with the capacity to present antigens and activate lymphocytes. Inflammatory macrophages are essential amplifiers of alloimmunity and critical mediators of allograft injury,^{1,2} and

Received 14 October 2019. Revision received 16 December 2019.

Accepted 27 December 2019.

¹ Immunodeficiencies and Transplant Immunology Group, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Universitario 12 de Octubre (imas 12), Madrid, Spain.

² Department of Immunology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain.

³ Department of Immunology, Ophthalmology and ENT, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.

⁴ Cardioresenal Translational Laboratory, imas12, Madrid, Spain.

⁵ CIBER-CV, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain.

⁶ Unit of Infectious Diseases, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain.

⁷ Department of Surgery and Abdominal Organs Transplantation, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain.

⁸ Department of Nephrology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain.

This research has been funded by PIE13/00045 project from Instituto de Salud Carlos III (cofunded by the European Regional Development Fund) and by

IDEAS206PAZ project from AECC (Asociación Española Contra el Cáncer) to E.P.-A. M.F.-R. holds a research contract "Miguel Servet" (CP18/00073) from the Instituto de Salud Carlos III, Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities. The other authors declare no conflicts of interest.

A.U.-R., R.L.-G., and E.P.-A. participated in research design. A.U.-R., R.L.-G., F.C.-R., M.C.-L., C.G.-C., E.R.-S., and G.R.-H. participated in the performance of research. A.U.-R., M.C.-L., C.G.-C., A.S., and M.F.-R. participated in data analysis. I.J. recruited liver transplant recipients. E.G. and A.A. recruited kidney transplant recipients. A.U.-R., R.L.-G., and E.P.-A. wrote the article.

ORCID: 0000-0001-8814-8410 (A.U.-R.).

Supplemental digital content (SDC) is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text, and links to the digital files are provided in the HTML text of this article on the journal's Web site (www.transplantjournal.com).

Correspondence: Alberto Utrero-Rico, MSc, Immunodeficiencies and Transplant Immunology Group, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Universitario 12 de Octubre (imas12), Madrid, Spain. (alutrero@gmail.com).

Copyright © 2020 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

ISSN: 0041-1337/20/10412-2599

DOI: 10.1097/TP.0000000000003179

are prominent among the cells that infiltrate the allograft in acute rejections.³

On the other hand, myeloid cells with suppressive properties have been observed in long-term survival renal allografts in humans,⁴ and immunosuppressive monocytes and macrophages are required for the induction or maintenance of tolerance in rodent⁵⁻⁷ and nonhuman primate transplant models.⁸

Immunosuppressive myeloid cells include a heterogeneous immature population which mobilizes during chronic inflammatory pathological conditions such as cancer or chronic infections. These cells, usually known as myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), express the myeloid lineage markers (CD33 and CD11b) together with low or no expression of HLA-DR.⁹ Three subpopulations of human MDSC have been described according to the expression of CD14 and CD15: early-stage MDSC (CD14⁻CD15⁻), polymorphonuclear MDSC (PMN-MDSC, CD14⁻CD15⁺), and monocytic MDSC (M-MDSC, CD14⁺CD15⁻).¹⁰ PMN-MDSC and M-MDSC immunosuppressive capacities are mediated by different mechanisms, although not exclusive for each cell type. In brief, PMN-MDSCs inhibit T cell responses by producing reactive oxygen species (ROS), and M-MDSC synthesizes more anti-inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-10, together with arginase 1 (Arg-1) and nitric oxide synthase which deplete essential aminoacids and promote an oxidative environment impairing T cell activity. In patients with cancer, MDSCs mobilize and infiltrate the tumor, are elevated in peripheral blood, and associate with poor prognosis, and so their elimination could help to avoid the tumoral growth and to promote antitumor immune response.¹¹ Conversely, in the setting of solid organ transplantation, MDSC mobilization and activation could help to tolerate the allograft and prolong its survival.^{12,13}

The analysis of MDSC effects in human kidney transplantation is limited to a few studies including small numbers of patients.¹⁴⁻¹⁸ We conducted a prospective study where we identified M-MDSC in kidney transplant recipients (KTRs), as defined by the CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD15⁻HLA-DR^{-low} phenotype and their capacity to inhibit lymphocyte proliferation. M-MDSCs increased early after transplantation and predicted de novo malignancy development within the first 2 y posttransplant. The number of M-MDSCs correlated with increased circulatory Arg-1 activity, high IL-10, and decreased total antioxidant capacity (TAC), thereby favoring an immunosuppressive environment that could facilitate the development of cancer in kidney recipients.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Healthy Volunteers

We prospectively studied a cohort of 229 end-stage renal disease patients who underwent kidney transplantation in Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid, Spain) between November 2014 and June 2016. Peripheral blood was drawn at pretransplant and at days 7, 14, and 30, and months 3, 6, and 12 posttransplant. Clinical and immunologic data were collected for 2 y posttransplantation. A group of 22 age- and gender-matched healthy volunteers (HVs) and 30 liver transplant recipients were also recruited. All subjects signed a written informed consent.

The study (PIE13/0045) was approved by the institutional review board.

Flow Cytometry Analysis

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated by density-gradient centrifugation on Lymphoprep (StemCell). Myeloid cells were measured on fresh PBMCs at each time point by using the monoclonal antibodies: CD33-PE-Cy7 (eBioscience), CD11b-PE (Beckman Coulter), HLA-DR-APC (BD Bioscience), CD14-FITC (BD Bioscience), and CD15-PerCP-Cy5.5 (Miltenyi-Biotec). Labeled PBMCs were acquired using a FACS Canto II flow cytometer and Diva software, and data were analyzed with FlowJo V10 software. We defined 2 myeloid cell populations: M-MDSC as CD11b⁺CD33⁺CD14⁺CD15⁻HLA-DR^{-low} and monocytes as CD11b⁺CD33⁺CD14⁺CD15⁻HLA-DR⁺.

Flow Cytometry Sorting and Giemsa Staining

CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD15⁻HLA-DR⁺ and CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD15⁻HLA-DR^{-low} myeloid cells were sorted using a FACS Aria (BD Bioscience). Cells were placed into a Double Cytofunnel (Thermo Scientific). The Cytofunnels were centrifuged and cells were fixed by methanol. Then, cells were stained with Wright-Giemsa stain.

In Vitro Immunosuppression Assay

CD33⁻ and CD33⁺ cells were separated using CD33 microbeads (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer instructions. For all experiments, the purity of CD33⁻ fraction was >95% and the purity of CD33⁺ fraction was >90%. More than 75% of CD33⁻ cells were T lymphocytes.

CD33⁻ fraction was labeled with 2.5 μM of carboxy-fluorescein succinimidyl ester (CFSE). The CFSE-labeled CD33⁻ cells were cultured alone as negative proliferation control; with 1.25 μg/mL of soluble anti-CD3 and 0.5 μg/mL of soluble anti-CD28 as positive proliferation control; and with stimulus and different ratio of autologous CD33⁺ cells. Supernatants were collected and frozen, and cells were labeled with CD4-Krome Orange (Beckman Coulter) and CD8-PerCP-Cy5.5 (BD Bioscience) and analyzed by flow cytometry (FC). We used FlowJo V10 to assess T cell proliferation.

Arginase 1 Activity

Arg-1 activity was analyzed in frozen serum samples from KTRs at days 7 and 30 posttransplantation by QuantiChrom Arginase Assay Kit (BioAssay Systems) according to manufacturer instructions. Samples were previously centrifuged in an Amicon ultra-0.5 (10 kDa cutoff) (Sigma-Aldrich) to eliminate urea.

Cytokines Quantification

Frozen plasma from KTRs at day 14 posttransplantation and frozen supernatant of proliferation culture were used to measure granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), tumor necrosis factor alpha (TNFα), interferon gamma (IFNγ), IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, and IL-10 with a cytokine 10-plex human panel (Invitrogen) according to the manufacturer instructions. The data were analyzed by Luminex 100 (One Lambda).

Total Antioxidant Capacity

TAC was assessed in plasma of patients with an assay¹⁹ based on enhanced horseradish peroxidase-catalyzed luminol chemiluminescence adapted for a microplate reader. TAC was expressed as the area under the curve (AUC) of the time-dependent luminescence inhibition with respect to hydrogen peroxide.

Active Matrix Metalloproteinase-9

The activity of matrix metalloproteinase (MMP)-9 was assessed in plasma of patients by zymography. Zymography was performed on SDS-PAGE containing 0.1% gelatin in nonreducing conditions. Gels containing MMP-9 were incubated 24 h in 500 mmol/L Tris, 6 mmol/L calcium chloride, and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (BioRad, Hercules, CA). Optical density of bands containing active MMP-9 was quantified with ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Detection of Anti-HLA Antibodies

Anti-HLA antibody screening was performed in all patients pretransplantation and posttransplantation by multiplex microsphere-based FC (Luminex Technology, LABScreen Mixed kit, One Lambda, CA). The fluorescent signal was measured using LABScan 100 FC and analyzed by HLA Fusion software (One Lambda). The test was considered positive when the standard fluorescence intensity was above 40 000 for anti-HLA class I and class II beads. Anti-HLA antibodies developing after transplantation were considered de novo anti-HLA antibodies.

Statistics

Chi-square test was used to compare group distributions. Nonparametric Mann-Whitney *U* test was used to compare 2 groups. For comparison of cell proportions, we used 2-way ANOVA. Changes over 14 d post-transplant were evaluated with mixed-effect regression model for continuous outcome. The number of days from transplant to diagnosis of tumor was taken into account. Cutoffs were determined by receiver operating characteristic curves according to the best sensitivity and specificity. To evaluate the impact of day 14 M-MDSC, we used Cox regression, hazard ratio was calculated with 95% confidence interval. We used Pearson correlation coefficient to test association. Statistical analysis was performed using R and STATA13.0. For graphic representation, we used GraphPad Prism 6.

RESULTS

M-MDSCs Increase Immediately After Kidney Transplantation Despite Induction Therapy

Among the PBMC fraction, CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD15⁺HLA-DR^{-low} and CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD15⁺HLA-DR⁺ myeloid cells (monocytes) were identified by FC (Figure 1A). We reasoned that the former would correspond to M-MDSC. CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD15⁺HLA-DR^{-low} cells showed the round shape with indented nucleus morphology attributed to M-MDSC in previous reports^{17,20} (Figure 1B).

The proportions of M-MDSC and monocytes were similar in end-stage renal disease patients before transplantation

and age- and gender-matched HV (Figure S1, SDC, <http://links.lww.com/TP/B883>). When compared with pretransplantation, both absolute numbers and percentage of monocytes from KTRs significantly decreased at 7 and 14 d and 1 and 3 mo posttransplant (Figure 1C and D and Figure S2A, SDC, <http://links.lww.com/TP/B883>). In contrast, M-MDSC significantly increased at every posttransplant time point, both in absolute number and percentage (Figure 1C and E and Figure S2B, SDC, <http://links.lww.com/TP/B883>). This augmentation was observed along the first year posttransplantation and exclusively affected the M-MDSC, as the remaining low-density, PBMC fraction (ie, lymphocytes) diminished after transplantation (Figure S3, SDC, <http://links.lww.com/TP/B883>). We hypothesized that the rapid increase of M-MDSC after transplantation could be triggered by proinflammatory signals delivered from surgery. In support of this idea, a significant mobilization of M-MDSC was also observed early after transplantation in a cohort of liver allograft recipients (Figure S4, SDC, <http://links.lww.com/TP/B883>). Alternatively, the profile of augmented M-MDSC and reduced monocytes along the first posttransplant year could also be explained by the parallel use of steroids, which were administered at high dose during induction and gradually reduced over the same timeframe.

By separately analyzing myeloid cells in patients receiving no induction (n=32), basiliximab (n=89) or antithymocyte globulin (ATG) (n=108), we deciphered that the reduction of monocytes, and total lymphocytes, could be mostly attributed to depletion by ATG, while they remained unaffected by basiliximab (Figure 1F and Figure S5, SDC, <http://links.lww.com/TP/B883>). On the contrary, ATG and basiliximab had little effect on M-MDSCs, as they increased after transplantation in all 3 groups of KTRs (Figure 1G).

Myeloid Cells From KTRs After Transplantation Inhibit T Cell Proliferation

We asked if the posttransplant increased myeloid CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD15⁺HLA-DR^{-low} cells show immunosuppressive function and could then be considered true M-MDSC. CD33⁺ cells isolated from HV and 14 d post-transplantation KTRs were cocultured with autologous CFSE-labeled CD33⁻ cells. In cultures, CD33⁻ cells proliferation in the absence of CD33⁺ cells was similar in HV or transplanted patients (Figure 1H and I), despite these being under therapeutic immunosuppression. CD33⁺ cell fraction from HV, with higher proportion of monocytes (Figure S6, SDC, <http://links.lww.com/TP/B883>), promoted CD4 and CD8 T cell proliferation in vitro (Figure 1H and J), while on the contrary, the CD33⁺ myeloid compartment from KTR, enriched in CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD15⁺HLA-DR^{-low} cells (Figure S6, SDC, <http://links.lww.com/TP/B883>), inhibited both CD4 and CD8 T cell proliferation (Figure 1I and J). According to their proliferation inhibitory capacities, levels of the proinflammatory cytokines IFN γ , TNF α , and GM-CSF were significantly reduced in supernatants from cultures with KTR-CD33⁺ myeloid cells versus cultures with HV-CD33⁺ myeloid cells (Figure 1K). In summary, CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD15⁺HLA-DR^{-low} myeloid cells increased after transplantation. Because of their phenotype, morphology, and in vitro immunosuppressive properties, these cells could correspond to M-MDSC.

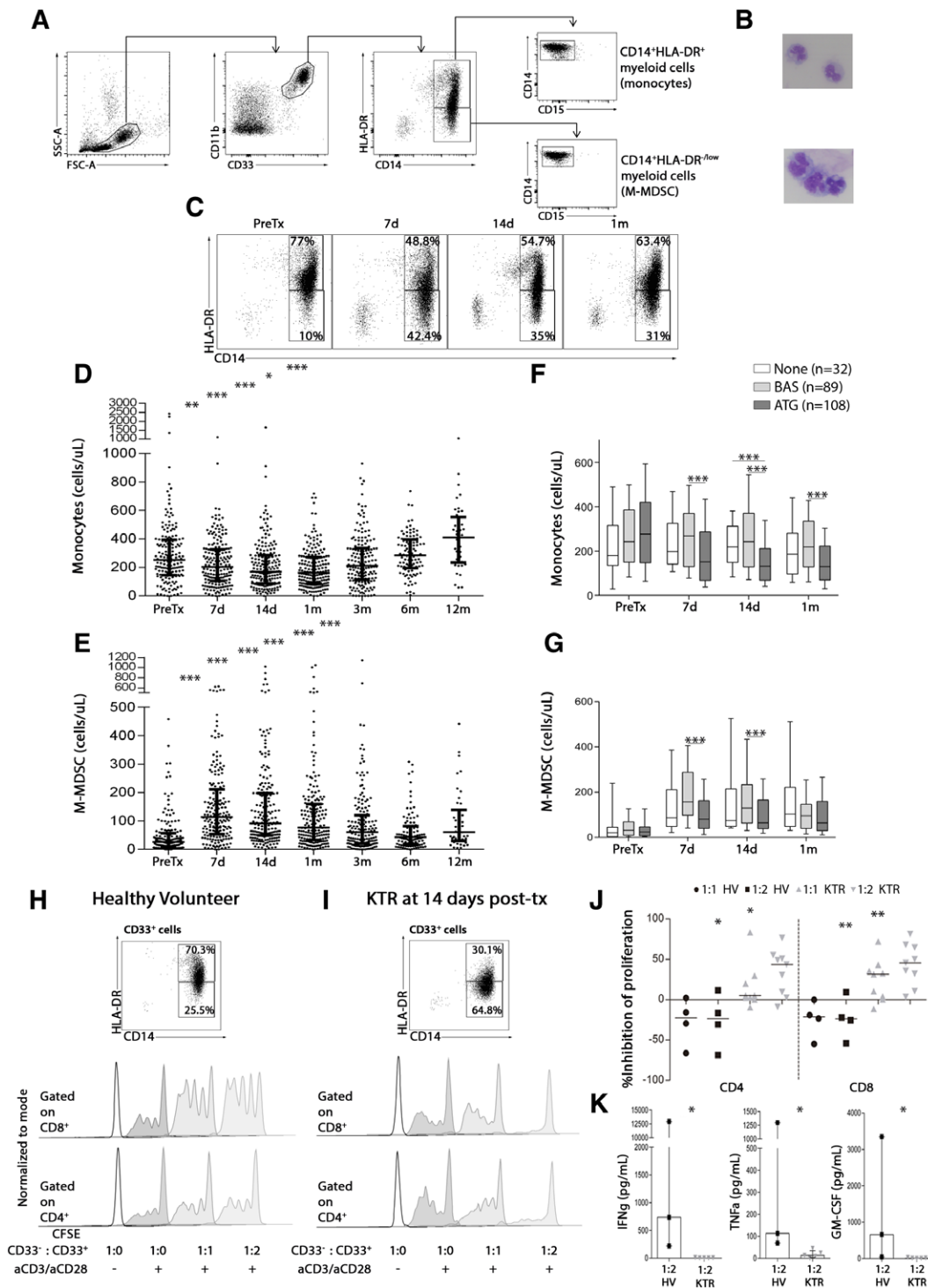


FIGURE 1. Monocytic myeloid-derived suppressor cells (M-MDSCs) increase after kidney transplantation despite induction therapy and inhibit CD4 and CD8 T cell proliferation. **A**, Flow cytometry (FC) strategy identifying myeloid CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD15⁺HLA-DR⁺ cells (monocytes) and CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD15⁺HLA-DR^{low} (M-MDSC). **B**, Giemsa-staining of each FC-sorted myeloid cell type. **C**, Representative kidney transplant recipient (KTR) myeloid compartment pretransplant and 7 d, 14 d, and 1 mo posttransplant. **D**, One-year posttransplant follow-up of CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD15⁺HLA-DR⁺ myeloid cells and **(E)** M-MDSC absolute numbers. **F**, Induction therapy effect on monocytes and **(G)** M-MDSC absolute numbers, in the first mo posttransplant. **H**, Proliferation of autologous carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)-labeled CD33⁺ cells cocultured with ex vivo isolated CD33⁺ cells from healthy volunteer (HV) (n=4) **(I)** or KTR at 14 d posttransplant (n=9). **J**, Percent inhibition of CD4 and CD8 T cells proliferation (proliferation of positive control-proliferation of 1:1 or 1:2 culture) in cultures with HV or KTR CD33⁺ myeloid cells. **(K)** Levels of interferon gamma (IFNg), tumor necrosis factor alpha (TNFα), and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in supernatant of CD33⁻:CD33⁺ (1:2) cocultures. **D** and **E**, Show median and interquartile range; **(F** and **G)** box represents median and 25th and 75th percentiles and whiskers represent 10th and 90th percentiles; **(J)** lines represent median; and **(K)** bar represents median and line represents minimum and maximum. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001. 7d, 7 d posttransplantation; 14d, 14 d posttransplantation; 1m, 1 mo posttransplantation; 3m, 3 mo posttransplantation; 6m, 6 mo posttransplantation; 12m, 12 mo posttransplantation; ATG, antithymocyte globulin; BAS, basiliximab; FSC, forward scatter; None, no induction therapy; post-tx, posttransplantation; PreTx, pretransplantation; SSC, side scatter.

High Levels of M-MDSC After Transplantation Associated With Higher Risk of De Novo Malignancy Development Within 2 Y Posttransplantation

In our exploratory analysis about the effect of M-MDSC on posttransplant events, we observed that the early posttransplant increase of M-MDSC was significantly higher in patients who developed cancer within the first 2 y after transplantation (Figure 2A). In our cohort, 10 KTRs (4.37%) developed histologically confirmed de novo malignancy during that time period (median and minimum–maximum d to tumor diagnosis: 374.5 [195–555]) (Table S1, SDC, <http://links.lww.com/TP/B883>).

KTRs who developed de novo malignancy already showed higher M-MDSC percentage before transplantation than patients who did not develop cancer (19.7% versus 7.8%; $P=0.028$; Figure 2A). After transplantation, KTRs who developed de novo malignancy had higher percentage of M-MDSC and lower percentage of monocytes (Figure 2A and B). We observed a similar tendency to reduction of monocytes and augmentation of M-MDSC absolute numbers after transplantation in cancer patients (Figure 2C and D). At posttransplantation day 14, both M-MDSC percentage and absolute numbers were significantly higher in cancer versus noncancer patients (46.2% versus 33.4%; $P=0.028$ and 227.8 versus

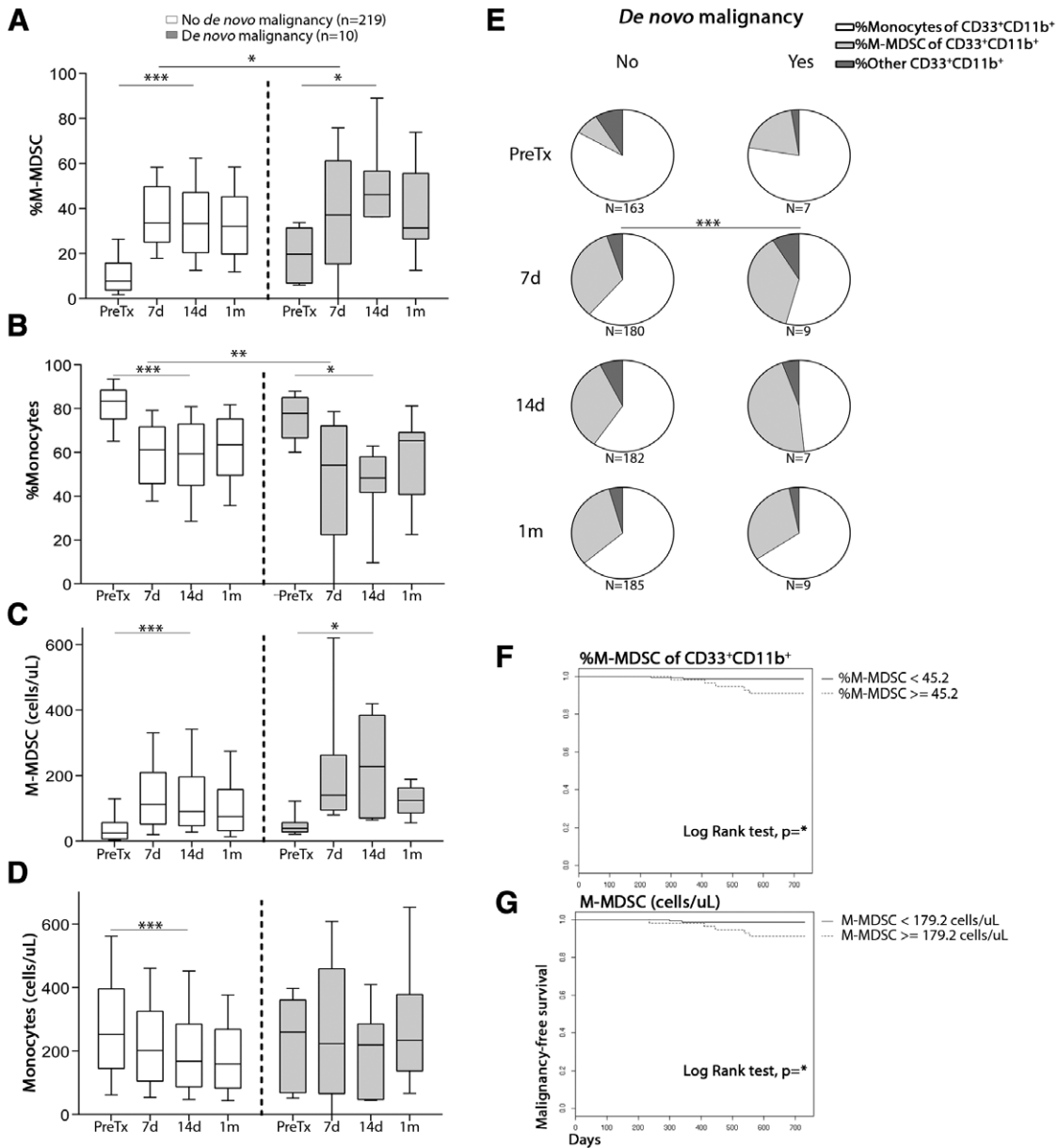


FIGURE 2. Kidney transplant recipients (KTRs) who developed de novo malignancy showed significantly higher monocytic myeloid-derived suppressor cell (M-MDSC) levels during the first mo posttransplantation. A, First mo posttransplant follow-up of M-MDSC percentage. B, HLA-DR⁺ myeloid cell percentage. C, M-MDSC absolute number. D, Monocytes absolute number, stratified by de novo malignancy development. E, Composition of myeloid cell compartment (CD33⁺CD11b⁺, as in third panel of Figure 1A), in KTRs who developed or did not develop de novo malignancy. Portions represent percentage medians of each cell population. F, Kaplan-Meier analysis of de novo malignancy free survival in the first 2 y posttransplantation according to M-MDSC percentage or (G) to M-MDSC absolute numbers cutoffs, as determined by receiver operating characteristic (ROC) curves. A–D, Box represents median and 25th and 75th percentiles and whiskers represent 10th and 90th percentiles. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. 7d, 7 d posttransplantation; 14d, 14 d posttransplantation; 1m, 1 mo posttransplantation; PreTx, pretransplantation.

90.6 cells/ μ L; $P=0.037$, respectively). Thus, each increase of 1% of M-MDSC at 14 d posttransplantation confers 4% higher probability to develop de novo malignancy in the 2 first years posttransplantation (hazard ratio=1.04; 95% confidence interval, 1.003-1.072; $P=0.037$). The proportions of cells within the myeloid compartment were different between patients who developed or did not develop cancer, being M-MDSC is overrepresented in the former (Figure 2E).

Clinical characteristics were similar between patients who developed or did not develop cancer within 2 y after transplantation, including known risk factors such as age, gender, or time in dialysis.²¹ Posttransplant days 1 to 14 median tacrolimus through levels were also similar in patients with or without de novo cancer (Table 1).

Stratifying the patient cohort according to day 14 M-MDSC, we found that KTRs with >45.2% of M-MDSC (AUC: 0.75, specificity: 0.73, and sensitivity: 0.71) and KTRs with >179.2 M-MDSC per microliter (AUC: 0.73, specificity: 0.72, and sensitivity: 0.71) had significantly lower malignancy-free survival within the first 2 y posttransplantation (Figure 2F and 2G, respectively). Moreover, KTRs with 14-d values of M-MDSC >45.2% or >179.2 cells/ μ L showed respectively 6.21 and 6.07 more likelihood to develop de novo malignancy (Table 2). The multivariate Cox regression model corrected for age, gender, and immunosuppression showed that M-MDSC >179.2 per microliter remained as an independent risk factor and conferred 6.96 times more risk to develop de novo malignancy (Table 2).

KTRs With Anti-HLA Antibodies Posttransplantation Show Lower M-MDSC

We speculated that the observed mobilization of M-MDSC could probably be promoting an immunosuppressive environment that favored the development of cancer in KTRs. Conversely, lower M-MDSC could facilitate more potent alloimmune responses and could be found in patients experiencing biopsy-proven acute rejection (BPAR) or anti-HLA antibodies formation. In our cohort, 27 out of 229 KTRs (11.8%) suffered BPAR according to Banff criteria²² (median and minimum–maximum d to BPAR: 96 [8–646]) and 17 out of 229 KTRs (7.4%) developed de novo anti-HLA antibodies. KTRs who experienced BPAR showed a trend to diminished M-MDSC absolute numbers at each posttransplant measurement (Figure 3A). KTRs who had either preformed or de novo anti-HLA antibodies in the first year posttransplantation showed lower M-MDSC per microliter than KTRs without antibodies, being the differences significant at day 7 posttransplant (Figure 3B).

In summary, M-MDSC were higher in KTRs who developed cancer and lower in patients with BPAR or anti-HLA antibodies. In concordance with observations showing that inhibition of CD11b polarizes macrophages toward an immunosuppressive profile,²³ both monocytes and M-MDSC expressed significantly less CD11b in KTRs with than without de novo cancer (Figure S7, SDC, <http://links.lww.com/TP/B883>).

High M-MDSCs Correlate With Increased Arginase 1 Activity and IL-10 and Decreased Total Antioxidant Capacity

To analyze whether the early posttransplant increased M-MDSC could promote an immunosuppressive environment through production of soluble mediators, we

measured circulatory Arg-1 activity, TAC, active MMP-9, and GM-CSF, TNF α , IFN γ , IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, and IL-10 levels in KTRs who developed and did not develop de novo malignancy.

Higher Arg-1 activity positively correlated with the number of M-MDSCs, but not with the number of monocytes or neutrophils (Figure S8A–C, SDC, <http://links.lww.com/TP/B883>).

Through upregulation of Arg-1 and nitric oxide synthase, M-MDSCs enhance the production of reactive oxygen or nitrogen species. Because of the difficulties to quantify plasma levels of these short half-life oxidative molecules,^{24,25} TAC, which represents the total antioxidant activity can be measured instead. At 7 d posttransplantation, only M-MDSC numbers (but not monocytes or neutrophils) were significantly higher in patients with lower TAC (Figure S8D and E, SDC, <http://links.lww.com/TP/B883>).

Regarding the analyzed cytokines, only IL-10 levels positively correlated with M-MDSC and did not with monocyte or neutrophil counts (Figure S8F, SDC, <http://links.lww.com/TP/B883>).

DISCUSSION

MDSC mobilization is related with long-lasting inflammation including chronic infection and cancer. Similarly to previous reports,^{16–18} here we observe that M-MDSCs rapidly increase after kidney, as well as after liver transplantation, which suggests that the acute inflammation from transplant surgery provides enough signals to boost the production or differentiation of these cells. In agreement with this inflammation-induced increase in M-MDSC, an augmentation of circulatory suppressive, CD14^{high}CD16[–] monocytes expressing low HLA-DR has been observed 48 h after the onset of acute pancreatitis.²⁶ When tested in vitro, the increased CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD15[–]HLA-DR^{–/low} cells inhibited the proliferation of CD4 and CD8 T lymphocytes and the production of proinflammatory cytokines, then representing true M-MDSC. Similarly, Luan et al¹⁷ found that the in vitro suppressive function of KTR circulatory CD33⁺CD11b⁺HLA-DR[–] cells was predominantly due to CD14⁺ M-MDSC.

M-MDSC augmented in all 3 groups of patients, either untreated or treated with basiliximab or ATG as induction therapy, which suggests that M-MDSCs are unaffected by these drugs or, if affected, that the effect of inflammatory signals predominates favoring their development. In contrast, ATG has been shown to bind and reduce MDSC number and suppressive capacity in Lewis lung carcinoma-bearing mice.²⁷ Differences related to the studied species, murine or human, and model, experimental cancer or clinical kidney transplantation, may explain the contradictory observations.

We and others have found that, in comparison to pretransplant, M-MDSCs remain elevated during the first year after transplantation,^{15,17,18} which suggests they are also resistant to the tacrolimus-based maintenance therapy or activated by the permanent stimuli from the allograft. The role of calcineurin inhibitors on MDSC remains unclear, with some mice studies reporting that cyclosporine decreases MDSC number in a dose dependent-manner,²⁸ whereas others concluding that cyclosporine increases MDSC number and function.²⁹ The effect of tacrolimus on MDSC has not been experimentally addressed yet.

TABLE 1.**Characteristics of kidney transplant recipients with and without de novo cancer within 2 y after transplantation**

Characteristics	Non-de novo malignancy (n = 219)	De novo malignancy (n = 10)	p
Recipient age, median (IQR)	54.9 (16.7–83.5)	62.35 (49.1–79.3)	0.079
Recipient gender, male, n (%)	160 (73)	7 (70)	1
Smoking, yes, n (%)	88 (40.2)	6 (60)	0.3591
Previous malignancy, yes, n (%)	31 (14.2)	2 (20)	0.9567
Dialysis prior transplantation, yes, n (%)	193 (88.1)	9 (90)	1
Days in dialysis, median (IQR)	561 (80–9572)	1300 (171–1887)	0.61
Cause of end-stage renal disease, n (%)			0.3989
Membranoproliferative glomerulonephritis	5 (2.3)	0	
Focal segmental glomerulonephritis	13 (5.9)	0	
Other glomerulonephritis	8 (3.7)	0	
Hypertensive nephrosclerosis	18 (8.2)	1 (10)	
Diabetic nephropathy	47 (21.5)	0	
IgA nephropathy	22 (10)	2 (20)	
Lupus nephropathy	4 (1.8)	0	
Reflux nephropathy	7 (3.2)	0	
NSAID nephropathy	3 (1.4)	0	
Other nephropathy	9 (4.1)	0	
Polycystic kidney disease	27 (12.3)	1 (10)	
Vasculitis	5 (2.3)	0	
Amyloidosis	2 (0.9)	1 (10)	
Nephronophthisis	1 (0.5)	0	
Others	25 (11.4)	4 (40)	
Unknown	23 (10.5)	1 (10)	
Previous kidney transplantation, n (%)			1
No	189 (86.3)	9 (90)	
Yes	30 (13.7)	1 (10)	
Transplant source, n (%)			0.3318
Brain death donor	140 (63.9)	9 (90)	
Uncontrolled circulatory death donor	27 (12.3)	1 (10)	
Controlled circulatory death donor	24 (11)	0	
Living donor	28 (12.8)	0	
De novo DSA posttransplantation, yes, n (%)	8 (3.6)	0	1
HLA mismatches, n (%)			0.7454
0	3 (1.4)	0	
1	4 (1.8)	0	
2	21 (9.6)	1 (10)	
3	31 (14.2)	0	
4	51 (23.3)	4 (40)	
5	68 (31)	4 (40)	
6	41 (18.7)	1 (10)	
Type of transplantation, n (%)			0.6932
Kidney alone	204 (93.2)	10 (100)	
Liver and kidney	4 (1.8)	0	
Pancreas and kidney	11 (5)	0	
Type of induction therapy, n (%)			0.2755
No	29 (13.2)	3 (30)	
Basiliximab	85 (38.8)	4 (40)	
Thymoglobulin	105 (48)	3 (30)	
Delayed graft function, n (%)	105 (47.9)	4 (40)	0.8558
BPAR within 2 y of transplantation, n (%)	26 (11.9)	1 (10)	1
Tacrolimus levels, ng/mL ^a	9	8.13	0.92

^aMedian of d 1 to 14.

BPAR, biopsy-proven acute rejection; DSA, donor specific antibodies; IQR, interquartile range; NSAID, non-steroid anti-inflammatory drug.

TABLE 2.**Univariate and multivariate hazard ratios for de novo cancer from a Cox regression model**

Variable	Crude HR (95% CI)	P	Adjusted HR (95% CI)	Adjusted P
Age	1.04 (0.99-1.09)	0.089	—	—
Type of induction				
BAS	0.48 (0.11-2.12)	0.330	—	—
TMG	0.29 (0.06-1.43)	0.128	—	—
Gender				
Woman	1.15 (0.30-4.44)	0.841	—	—
%M-MDSC of CD33 ⁺ CD11b ⁺				
≥45.2	6.21 (1.20-31.99)	0.029	5.16 (0.98-27.23)	0.053
M-MDSC, cells/uL				
≥172.9	6.07 (1.18-31.28)	0.031	6.98 (1.28-37.69)	0.024

—, not significant; BAS, basiliximab; CI, confidence interval; HR, hazard ratio; M-MDSC, monocytic myeloid-derived suppressor cell; TMG, thymoglobulin. Bold entries indicate a *p*-value < 0.05.

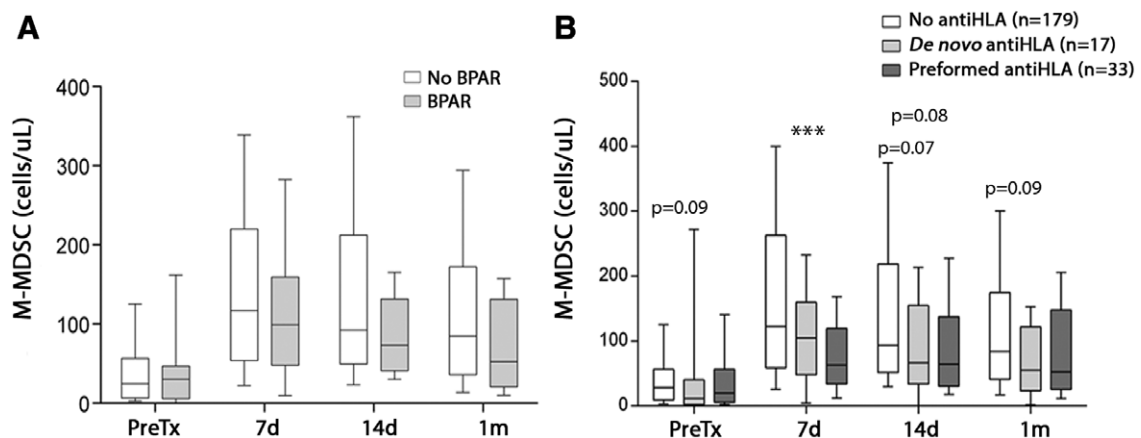


FIGURE 3. First mo posttransplant monocytic myeloid-derived suppressor cell (M-MDSC) are lower in patients who reject (biopsy-proven acute rejection [BPAR]) or developed anti-HLA antibodies. A, M-MDSC cell counts were inferior in patients experiencing rejection (BPAR, *n* = 27) vs nonrejectors (*n* = 202) at every time point. B, M-MDSC cell counts were inferior in patients who developed de novo anti-HLA antibodies or with preformed anti-HLA antibodies vs kidney transplant recipient (KTR) with no anti-HLA antibodies pretransplant and posttransplant. Box represents median and 25th and 75th percentiles and whiskers represent 10th and 90th percentiles. ****P* < 0.001. 7d, 7 d posttransplantation; 14d, 14 d posttransplantation; 1m, 1 mo posttransplantation; PreTx, pretransplantation.

In our initial, unbiased analysis of the KTR cohort, we found that the strongest correlation between M-MDSC and posttransplant events corresponded to increased M-MDSCs and de novo cancer. This is an important observation indicating that the mobilization of M-MDSC is not only contemporary but that it may also precede cancer. After the emergence of a tumor, MDSCs are considered key for the formation of premetastatic niches that receive incoming cancer cells.³⁰ MDSCs accumulate in the lungs of mice with mammary adenocarcinoma before the arrival of malignant cells.³¹ Several MDSC-derived mechanisms have been invoked to participate in the microenvironment preconditioning for the tumoral colonization, including both local modifications and systemic effects on the immune system. It is plausible to speculate steadily elevated MDSC levels in peripheral blood and migrating into tissues could promote an immunosuppressive microenvironment that would favor also the growing of the primary tumor. According to this hypothesis, we observed that 3 mo after transplantation, patients who developed de novo malignancy still maintained higher M-MDSC than patients who did not (*n* = 5, 129.2 cells/ μ L versus *n* = 161, 53.4 cells/ μ L, respectively, *P* = 0.087, data not shown).

Pharmacological immunosuppression is a well-recognized risk factor for posttransplant cancer. Malignancy has shown an increased incidence in relationship with prolonged treatment, higher doses of calcineurin-inhibitors,³²⁻³⁴ or the use of T cell-depleting agents.³⁵⁻³⁷ The burden of chronic immunosuppression may alter the immunosurveillance and help the tumoral growth through mechanisms including the reduction of CD8⁺ T cell counts,³⁸ decreased natural killer activity,³⁹ augmentation of T cells senescence,⁴⁰ and augmentation of regulatory T cell (Treg) numbers.^{41,42} Based on our findings, the early mobilized M-MDSCs, probably enhanced by the surgery inflammation and resistant to immunosuppressive therapy, may add to those mechanisms for the development of cancer in KTR.

Consistently, M-MDSCs were decreased in our cohort in situations of enhanced immune activation, as rejection and HLA sensitization. Reduced MDSC numbers have been found in intestinal transplant recipients with acute cell rejection.²⁰ The renal allograft survival after an acute rejection episode was significantly higher in recipients with augmented MDSCs.¹⁸ In patients with >10-y functional, stable kidney grafts and low doses of immunosuppression, M-MDSCs were significantly superior than in short-term

renal recipients, and M-MDSC levels correlated with survival rates.¹⁴ Altogether, these results point out to a beneficial role of MDSC in limiting the alloimmune response in favor of graft tolerance.

The protolerogenic effect of posttransplant MDSCs has been related partly to their capacity to induce Treg cells.^{17,18} Although expanded Treg could be beneficial and protect the allograft from rejection. High Treg numbers have been observed in KTRs with current solid organ cancer or cutaneous squamous cell carcinoma,⁴² and high numbers of peripheral blood and tumor-infiltrating Treg have been found to predict new squamous cell carcinoma in kidney recipients.⁴¹ Information about Treg is not provided by our study and remains a limitation. The lower expression of CD11b in myeloid cells of KTRs with de novo cancer reported here is consistent with the observation that loss of CD11b expression or function promotes immune-suppressive gene expression in tumor-associated macrophages, increases Treg, and decreases CD8 T cells recruitment to tumors.²³ Moreover, based on our findings, Arg-1 and IL-10, but not MMP-9 (Figure S8, SDC, <http://links.lww.com/TP/B883>), may also be contributing to the M-MDSC-related down-regulated immunity in KTRs. Probably because of the small number of patients developing cancer, the augmented Arg-1 and IL-10 in cancer patients did not reach statistical significance. M-MDSC-derived Arg-1, IL-10, and MMP-9 impair several immune functions and enhance cancer,^{9,43-46} although they may contribute differently in different clinical settings and tumor models.^{47,48} In the transplantation setting, prolongation of skin graft survival was observed in mice in which mobilized MDSCs after the engagement of the inhibitory receptor immunoglobulin-like transcript 2 (ILT-2) were high producers of Arg-1,⁴⁹ or in mice receiving LPS-derived MDSCs which made large amounts of IL-10.⁵⁰ In human renal biopsies of acute rejection with improved graft survival, a correlation was found among high intra-graft S100A9 expression, MDSC infiltration, and increased IL-10.⁵¹ Results in these models support a role for MDSC-derived Arg-1 and IL-10 as mediators of immune response downregulation in transplantation.

Because cancer-developing KTRs had more circulatory M-MDSCs, it could be anticipated that these patients may have higher plasmatic concentration of oxidative stress molecules. Direct assessment of ROS is difficult to perform because of their extremely short half-life. For this reason, we measured TAC as an indicator of plasma scavenging capacity of ROS. An inverse correlation was found between M-MDSC number and TAC, which suggests that the increase of M-MDSCs is hardly counterbalanced by the global antioxidant activity, then resulting in a net oxidative, immunosuppressive, protumoral environment. In support of this explanation, augmented oxidative species with TAC depletion has been reported in patients with oral precancer, oral squamous cell carcinoma, or colon cancer.^{52,53}

Taken together, these findings suggest that the augmentation in M-MDSC and their derived soluble factors precede, and may contribute to, the development of cancer in KTRs. Therefore, monitoring the circulatory myeloid cell compartment could be useful to anticipate cancer after transplantation. If confirmed in multicenter studies, M-MDSC measurement could be considered in the design of an immunomonitoring profile to anticipate risk for de novo malignancies in KTRs.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge all patients for their participation in the study, and the nurses from the Hemodialysis Unit, Nephrology and Transplant Coordination in Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid.

REFERENCES

- Liu W, Xiao X, Demirci G, et al. Innate NK cells and macrophages recognize and reject allogeneic nonself in vivo via different mechanisms. *J Immunol*. 2012;188:2703–2711. doi:10.4049/jimmunol.1102997
- Ochando J, Kwan WH, Ginhoux F, et al. The mononuclear phagocyte system in organ transplantation. *Am J Transplant*. 2016;16:1053–1069. doi:10.1111/ajt.13627
- Hancock WW, Thomson NM, Atkins RC. Composition of interstitial cellular infiltrate identified by monoclonal antibodies in renal biopsies of rejecting human renal allografts. *Transplantation*. 1983;35:458–463. doi:10.1097/00007890-198305000-00013
- Thomas J, Thomas F, Hoffmann S, et al. Macrophage-related suppressor cells in human renal transplant recipients. *Surgery*. 1979;86:266–274.
- Conde P, Rodríguez M, van der Touw W, et al. DC-SIGN(+) macrophages control the induction of transplantation tolerance. *Immunity*. 2015;42:1143–1158. doi:10.1016/j.immuni.2015.05.009
- Dugast AS, Haudebourg T, Coulon F, et al. Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *J Immunol*. 2008;180:7898–7906. doi:10.4049/jimmunol.180.12.7898
- Garcia MR, Ledgerwood L, Yang Y, et al. Monocytic suppressive cells mediate cardiovascular transplantation tolerance in mice. *J Clin Invest*. 2010;120:2486–2496. doi:10.1172/JCI41628
- Gray CM, Smit JA, Myburgh JA. Identification of non-T suppressor cells with possible contra-interleukin-2 properties in non-human primates tolerant to their renal allograft. *Afr J Health Sci*. 1995;2:354–358.
- Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:162–174. doi:10.1038/nri2506
- Bronte V, Brandau S, Chen SH, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun*. 2016;7:12150. doi:10.1038/ncomms12150
- Musolino C, Allegra A, Pioggia G, et al. Immature myeloid-derived suppressor cells: a bridge between inflammation and cancer (review). *Oncol Rep*. 2017;37:671–683. doi:10.3892/or.2016.5291
- Ochando J, Conde P, Utrero-Rico A, et al. Tolerogenic role of myeloid suppressor cells in organ transplantation. *Front Immunol*. 2019;10:374. doi:10.3389/fimmu.2019.00374
- Riquelme P, Haarer J, Kammler A, et al. TIGIT+ iTregs elicited by human regulatory macrophages control T cell immunity. *Nat Commun*. 2018;9:2858. doi:10.1038/s41467-018-05167-8
- Du XX, Guo YL, Zhao YP, et al. Accumulation of high levels of monocytic myeloid-derived suppressor cells enhances graft survival in almost-tolerant kidney transplant recipients. *Transplant Proc*. 2018;50:3314–3320. doi:10.1016/j.transproceed.2018.04.043
- Hock BD, Mackenzie KA, Cross NB, et al. Renal transplant recipients have elevated frequencies of circulating myeloid-derived suppressor cells. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27:402–410. doi:10.1093/ndt/gfr264
- Hock BD, McKenzie JL, Cross NB, et al. Dynamic changes in myeloid derived suppressor cell subsets following renal transplant: a prospective study. *Transpl Immunol*. 2015;32:164–171. doi:10.1016/j.trim.2015.05.001
- Luan Y, Mosheir E, Menon MC, et al. Monocytic myeloid-derived suppressor cells accumulate in renal transplant patients and mediate CD4(+) Foxp3(+) Treg expansion. *Am J Transplant*. 2013;13:3123–3131. doi:10.1111/ajt.12461
- Meng F, Chen S, Guo X, et al. Clinical significance of myeloid-derived suppressor cells in human renal transplantation with acute T cell-mediated rejection. *Inflammation*. 2014;37:1799–1805. doi:10.1007/s10753-014-9910-5
- Saleh L, Plieth C. Total low-molecular-weight antioxidants as a summary parameter, quantified in biological samples by a chemiluminescence inhibition assay. *Nat Protoc*. 2010;5:1627–1634. doi:10.1038/nprot.2010.120
- Okano S, Abu-Elmagd K, Kish DD, et al. Myeloid-derived suppressor cells increase and inhibit donor-reactive T cell responses to graft

- intestinal epithelium in intestinal transplant patients. *Am J Transplant*. 2018;18:2544–2558. doi:10.1111/ajt.14718
21. Au E, Wong G, Chapman JR. Cancer in kidney transplant recipients. *Nat Rev Nephrol*. 2018;14:508–520. doi:10.1038/s41581-018-0022-6
 22. Haas M, Sis B, Racusen LC, et al; Banff meeting report writing committee. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant*. 2014;14:272–283. doi:10.1111/ajt.12590
 23. Schmid MC, Khan SQ, Kaneda MM, et al. Integrin CD11B activation drives anti-tumor innate immunity. *Nat Commun*. 2018;9:5379. doi:10.1038/s41467-018-07387-4
 24. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, et al. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012;5:9–19. doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613
 25. Griendling KK, Touyz RM, Zweier JL, et al; American Heart Association Council on Basic Cardiovascular Sciences. Measurement of reactive oxygen species, reactive nitrogen species, and redox-dependent signaling in the cardiovascular system: a scientific statement from the American Heart Association. *Circ Res*. 2016;119:e39–e75. doi:10.1161/RES.000000000000110
 26. Zhang R, Shi J, Zhang R, et al. Expanded CD14HICD16- immunosuppressive monocytes predict disease severity in patients with acute pancreatitis. *J Immunol*. 2019;202:2578–2584. doi:10.4049/jimmunol.1801194
 27. Suk Lee Y, Davila E, Zhang T, et al. Myeloid-derived suppressor cells are bound and inhibited by anti-thymocyte globulin. *Innate Immun*. 2019;25:46–59. doi:10.1177/1753425918820427
 28. Chiasson VL, Bounds KR, Chatterjee P, et al. Myeloid-derived suppressor cells ameliorate cyclosporine A-induced hypertension in mice. *Hypertension*. 2018;71:199–207. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10306
 29. Han C, Wu T, Na N, et al. The effect of immunosuppressive drug cyclosporine A on myeloid-derived suppressor cells in transplanted mice. *Inflamm Res*. 2016;65:679–688. doi:10.1007/s00011-016-0949-7
 30. Wang Y, Ding Y, Guo N, et al. MDSCs: key criminals of tumor pre-metastatic niche formation. *Front Immunol*. 2019;10:172. doi:10.3389/fimmu.2019.00172
 31. Yan HH, Pickup M, Pang Y, et al. Gr-1+CD11B+ myeloid cells tip the balance of immune protection to tumor promotion in the pre-metastatic lung. *Cancer Res*. 2010;70:6139–6149. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0706
 32. Dantal J, Hourmant M, Cantarovich D, et al. Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. *Lancet*. 1998;351:623–628. doi:10.1016/S0140-6736(97)08496-1
 33. Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO, et al. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet*. 2007;370:59–67. doi:10.1016/S0140-6736(07)61050-2
 34. van Leeuwen MT, Webster AC, McCredie MR, et al. Effect of reduced immunosuppression after kidney transplant failure on risk of cancer: population based retrospective cohort study. *BMJ*. 2010;340:c570. doi:10.1136/bmj.c570
 35. Hall EC, Engels EA, Pfeiffer RM, et al. Association of antibody induction immunosuppression with cancer after kidney transplantation. *Transplantation*. 2015;99:1051–1057. doi:10.1097/TP.0000000000000449
 36. Lim WH, Turner RM, Chapman JR, et al. Acute rejection, T-cell-depleting antibodies, and cancer after transplantation. *Transplantation*. 2014;97:817–825. doi:10.1097/01.TP.0000442773.38510.32
 37. Opelz G, Naujokat C, Daniel V, et al. Disassociation between risk of graft loss and risk of non-hodgkin lymphoma with induction agents in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2006;81:1227–1233. doi:10.1097/01.tp.0000219817.18049.36
 38. Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Allende LM, et al. Assessing the risk of de novo malignancy in kidney transplant recipients: role for monitoring of peripheral blood lymphocyte populations. *Transplantation*. 2014;98:e36–e37. doi:10.1097/TP.0000000000000297
 39. Hope CM, Troelnikov A, Hanf W, et al. Peripheral natural killer cell and allo-stimulated T-cell function in kidney transplant recipients associate with cancer risk and immunosuppression-related complications. *Kidney Int*. 2015;88:1374–1382. doi:10.1038/ki.2015.237
 40. Bottomley MJ, Harden PN, Wood KJ. CD8+ immunosenescence predicts post-transplant cutaneous squamous cell carcinoma in high-risk patients. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27:1505–1515. doi:10.1681/ASN.2015030250
 41. Carroll RP, Segundo DS, Hollowood K, et al. Immune phenotype predicts risk for posttransplantation squamous cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21:713–722. doi:10.1681/ASN.2009060669
 42. Hope CM, Grace BS, Pilkington KR, et al. The immune phenotype may relate to cancer development in kidney transplant recipients. *Kidney Int*. 2014;86:175–183. doi:10.1038/ki.2013.538
 43. Beury DW, Parker KH, Nyandjo M, et al. Cross-talk among myeloid-derived suppressor cells, macrophages, and tumor cells impacts the inflammatory milieu of solid tumors. *J Leukoc Biol*. 2014;96:1109–1118. doi:10.1189/jlb.3A0414-210R
 44. Highfill SL, Rodriguez PC, Zhou Q, et al. Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. *Blood*. 2010;116:5738–5747. doi:10.1182/blood-2010-06-287839
 45. Sinha P, Clements VK, Bunt SK, et al. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J Immunol*. 2007;179:977–983. doi:10.4049/jimmunol.179.2.977
 46. Youn JI, Gabrilovich DI. The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *Eur J Immunol*. 2010;40:2969–2975. doi:10.1002/eji.201040895
 47. Lee SE, Lim JY, Kim TW, et al. Matrix metalloproteinase-9 in monocytic myeloid-derived suppressor cells correlate with early infections and clinical outcomes in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018;24:32–42. doi:10.1016/j.bbmt.2017.08.017
 48. Mackert JR, Qu P, Min Y, et al. Dual negative roles of C/EBP α in the expansion and pro-tumor functions of MDSCs. *Sci Rep*. 2017;7:14048. doi:10.1038/s41598-017-12968-2
 49. Zhang W, Liang S, Wu J, et al. Human inhibitory receptor immunoglobulin-like transcript 2 amplifies CD11B+Gr1+ myeloid-derived suppressor cells that promote long-term survival of allografts. *Transplantation*. 2008;86:1125–1134. doi:10.1097/TP.0b013e318186fccd
 50. De Wilde V, Van Rompaey N, Hill M, et al. Endotoxin-induced myeloid-derived suppressor cells inhibit alloimmune responses via heme oxygenase-1. *Am J Transplant*. 2009;9:2034–2047. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02757.x
 51. Rekers NV, Bajema IM, Mallat MJ, et al. Beneficial immune effects of myeloid-related proteins in kidney transplant rejection. *Am J Transplant*. 2016;16:1441–1455. doi:10.1111/ajt.13634
 52. Di Giacomo C, Acquaviva R, Lanteri R, et al. Nonproteic antioxidant status in plasma of subjects with colon cancer. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003;228:525–528. doi:10.1177/15353702-0322805-17
 53. Korde SD, Basak A, Chaudhary M, et al. Enhanced nitrosative and oxidative stress with decreased total antioxidant capacity in patients with oral precancer and oral squamous cell carcinoma. *Oncology*. 2011;80:382–389. doi:10.1159/000329811

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Table S1. Characteristics of kidney transplant recipients who developed de novo malignancy

Patients	Sex	Age	Type of induction	Maintenance therapy*	Type of de novo malignancy	Days from Tx to tumor diagnosis
1	Man	79.3	BAS	ST, Tac, MM	Basocellular skin cancer (epithelioma)	531
2	Man	52.7	No	ST, Tac, MM	Clear cell renal cell carcinoma	340
3	Man	54.9	No	ST, Tac, MM	Prostate acinar adenocarcinoma	322
4	Woman	49.1	ATG	ST, Tac, MM	Squamous cell carcinoma	299
5	Man	56.2	ATG	ST, Tac, MM	Mixed clear cell and papillary renal cell carcinoma	537
6	Woman	58	ATG	ST, Tac, MM	Basocellular skin cancer (epithelioma)	446
7	Man	68.2	BAS	ST, Tac, MM	Squamous cell carcinoma	235
8	Woman	72.8	No	ST, Tac, MM	Colon microinvasive adenocarcinoma	555
9	Man	66.7	BAS	ST, Tac, MM	Colon squamous cell carcinoma	409
10	Man	67.6	BAS	ST, Tac, MM	Colorectal carcinoma and liver metastasis	195

*ST: steroids, Tac: tacrolimus, MM: mycophenolate mofetil, Tx: transplantation

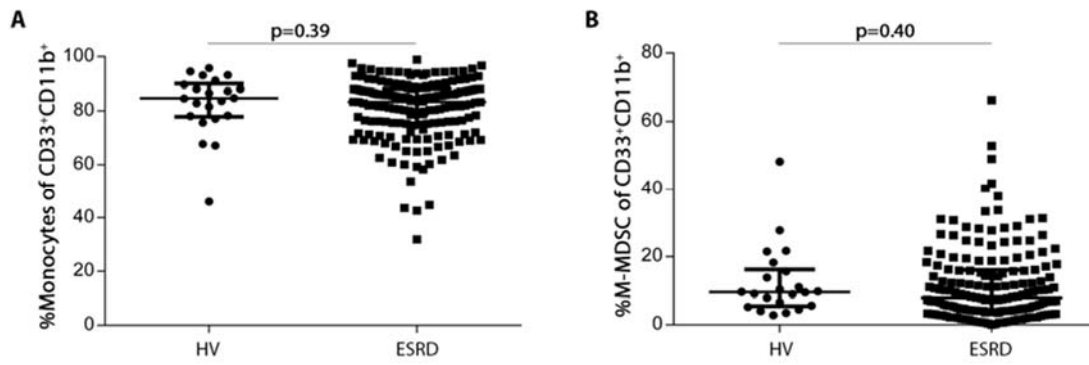


FIGURE S1. HV and ESRD patients had similar levels of monocytes and M-MDSC before transplantation. A, Percentage of monocytes and B, M-MDSC in HV and patients with ESRD. Lines represent medians and interquartile range. HV, healthy volunteers; ESRD, end stage renal disease patients.

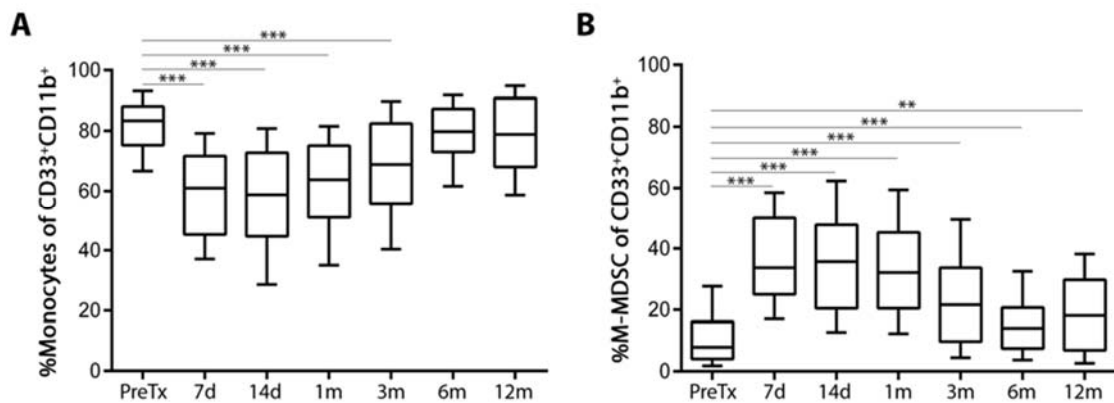


FIGURE S2. Evolution of myeloid cells in KTR after transplantation. A, monocytes and B, M-MDSC cells percent at days 7 and 14 and months 1, 3, 6 and 12 after transplantation. PreTx, pre-transplantation; 7d, 7 days post-transplantation; 14d, 14 days post-transplantation; 1m, 1 month post-transplantation; 3m, 3 month post-transplantation; 6m, 6 months post-transplantation; 12m, 12 months post-transplantation. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

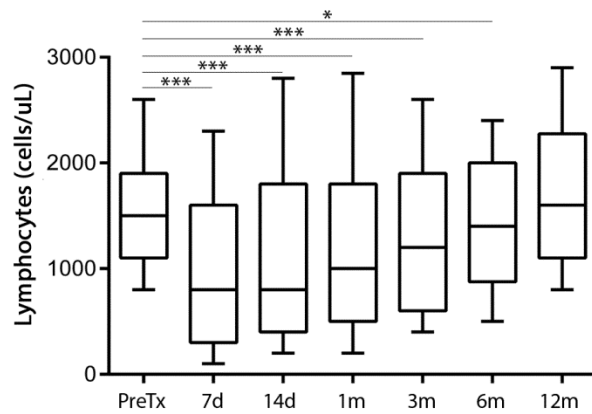


FIGURE S3. Lymphocytes after transplantation. Counts at days 7 and 14 and months 1, 3, 6 and 12 after transplantation. Boxes represent median and 25th and 75th percentiles and whiskers represent 10th and 90th percentiles. PreTx, pre-transplantation; 7d, 7 days post-transplantation; 14d, 14 days post-transplantation; 1m, 1 month post-transplantation; 3m, 3 month post-transplantation; 6m, 6 months post-transplantation; 12m, 12 months post-transplantation. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$.

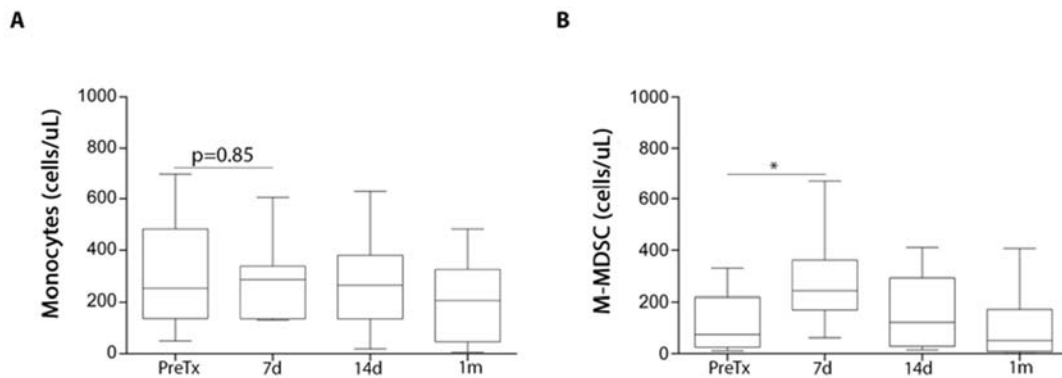


FIGURE S4. Evolution of myeloid cells in liver transplant recipients after transplantation. A, monocytes and B, M-MDSC counts at days 7, 14 and 30 after transplantation. Boxes represent median and 25th and 75th percentiles and whiskers represent 10th and 90th percentiles. PreTx, pre-transplantation; 7d, 7 days post-transplantation; 14d, 14 days post-transplantation; 1m, 1 month post-transplantation. *, $p < 0.05$.

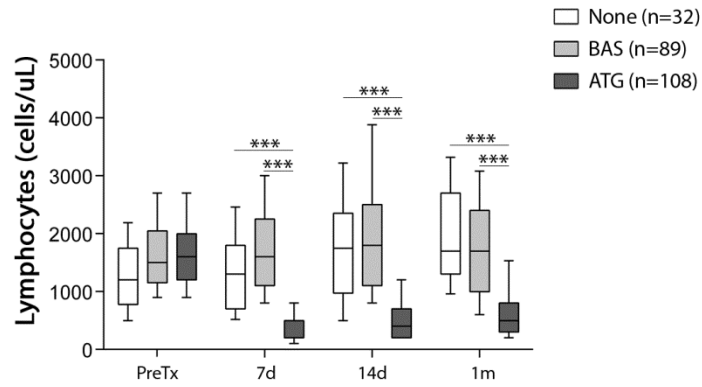


FIGURE S5. Effect of induction therapy on post-transplant lymphocyte counts. 1 month follow up of lymphocyte counts in KTR without induction (None) or receiving basiliximab (BAS) or thymoglobulin (ATG) as induction. Box represents median and 25th and 75th percentiles and whiskers represent 10th and 90th percentiles. PreTx, pre-transplantation; 7d, 7 days post-transplantation; 14d, 14 days post-transplantation; 1m, 1 month post-transplantation. ***, $p < 0.001$.

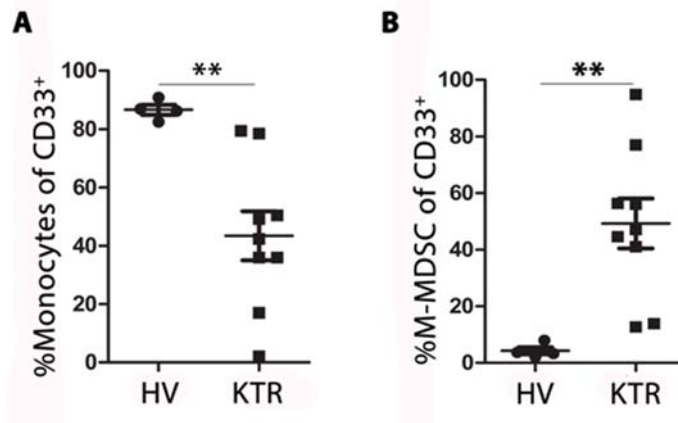


FIGURE S6. Relative composition of the isolated CD33⁺ cells from HV and KTR. KTR had lower percentages of HLA-DR⁺ cells (A) and higher percentages of M-MDSC (B) in CD33⁺ cells. Mann-Whitney U test. **, $p < 0.01$.

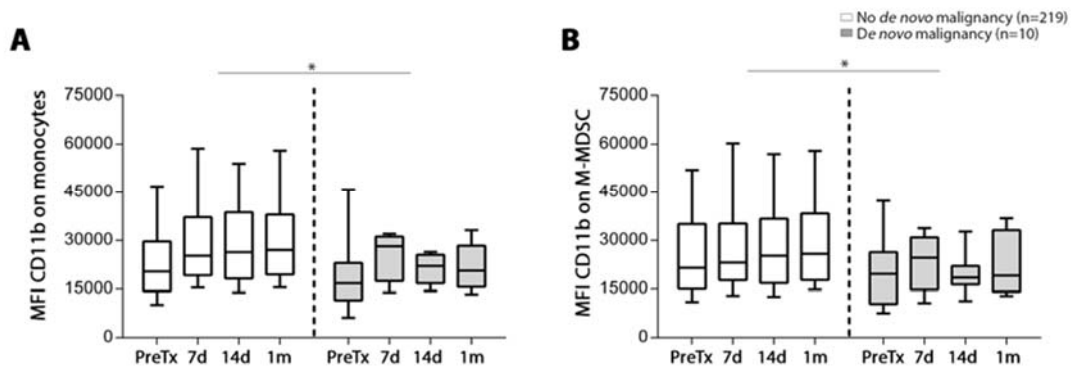


FIGURE S7. Diminished CD11b expression in myeloid cells from cancer-developing KTR. A, CD11b mean fluorescence intensity (MFI) in monocytes cells and B, in M-MDSC, in KTR with or without cancer. Boxes represent median and 25th and 75th percentiles and whiskers represent 10th and 90th percentiles. PreTx, pre-transplantation; 7d, 7 days post-transplantation; 14d, 14 days post-transplantation; 1m, 1 month post-transplantation. *, $p < 0.05$.

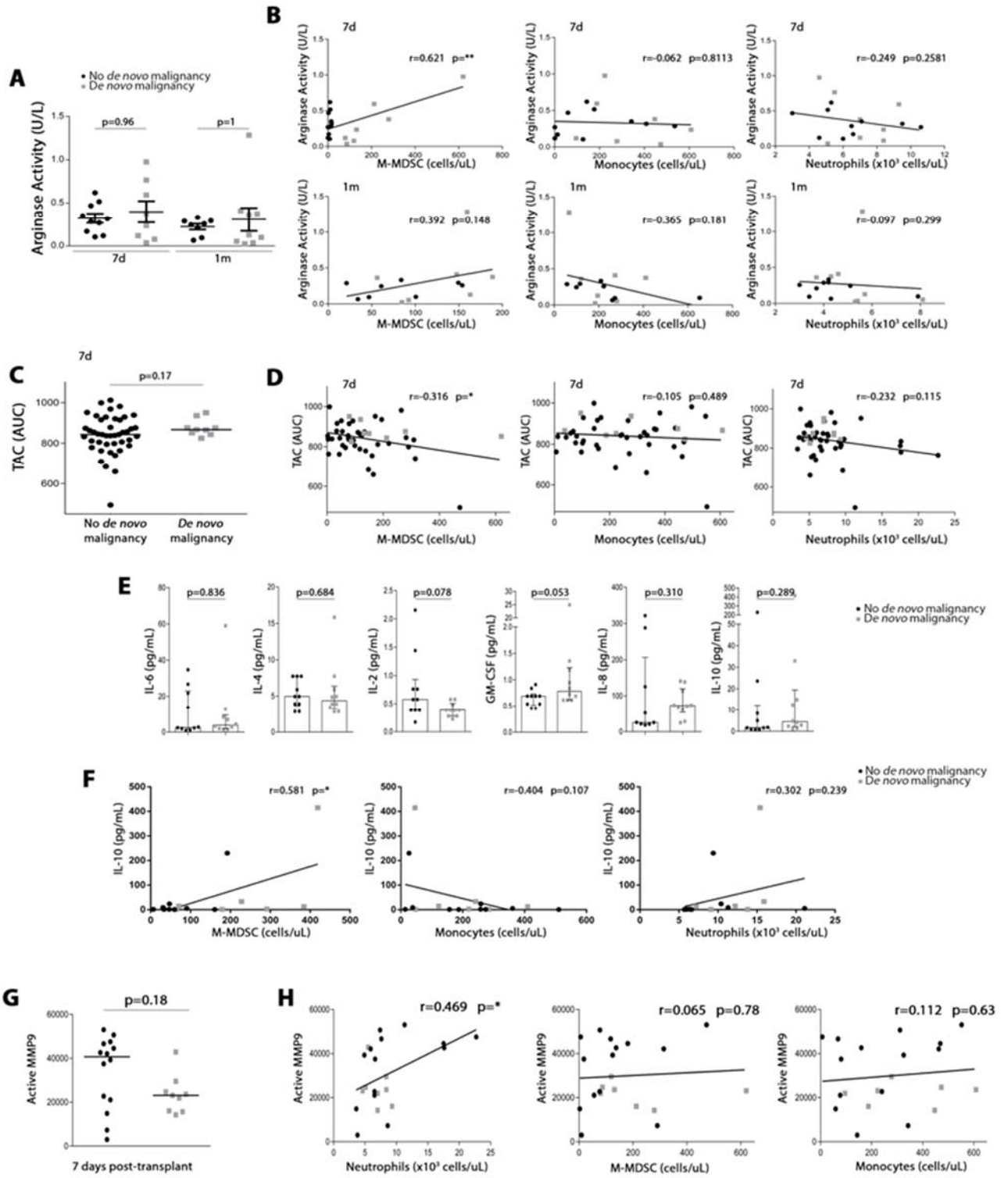


FIGURE S8. M-MDSC counts correlation with arginase 1 activity, TAC, IL-10 and MMP-9 circulating levels. A, Arginase 1 activity in serum from KTR who developed de novo malignancy (n=10) and from KTR with stable renal function without cancer (n=10), at 7 and 30 days post-transplantation. B, Correlation of arginase 1 activity with M-MDSC, monocytes and neutrophils counts, at 7 days and at 30 days post-transplantation. C, TAC level in KTR who developed de novo malignancy (n=10) and those who did not (n=46) at 7 days post-transplantation. D, Correlation of TAC levels with M-MDSC, monocytes and neutrophils counts at 7 days post-transplantation. E, Serum level of IL-6, IL-4, IL-2, GM-CSF, IL-8 and IL-10 in patients with (n=10) or without cancer (n=10). F, Correlation between IL-10 levels and M-MDSC, monocytes and neutrophils counts at 7 days post-transplantation. G, Circulatory active MMP-9 at day 7 post-transplant was lower in patients later developing than not developing cancer. H, Circulatory active MMP-9 at day 7 post-transplant directly correlated with neutrophil count, but did not correlate with monocytes or M-MDSC. *, p<0.05. 7d, 7 days posttransplantation; 1m, 1 month post-transplantation; r, correlation coefficient of Pearson. *, p<0.05; **, p<0.01.

CAPITULO 2: *Imbalance favoring follicular helper T cells over IL10⁺ regulatory B cells is detrimental for the kidney allograft*

Rocio Laguna Goya*, Alberto Utrero Rico*, Francisco Cano Romero, Elena Gómez Massa, Esther González, Amado Andrés, Esther Mancebo Sierra, Estela Paz Artal.

**Ambos autores contribuyeron de forma equitativa y comparten primera posición*

Kidney Int. 2020 Sep;98(3):732-743. doi: 10.1016/j.kint.2020.02.039. Epub 2020 Apr 20.

OBJETIVOS

Está bien descrito que el desarrollo de anticuerpos donante-específicos en el post-trasplante es un factor de riesgo para el rechazo y la pérdida del injerto renal. El desarrollo de estos anticuerpos ocurre tras la interacción de linfocitos T especializados, los linfocitos cTfh, con las células B. Pero, recientemente, se ha descrito una población de células B transicionales con capacidad para producir IL10, que se han denominado células B reguladoras y que serían capaces de modular la respuesta humoral y la función de los linfocitos Tfh. En el trasplante renal, hay evidencias de que las células B transicionales (CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}), que están enriquecidas en linfocitos B productores de IL10, juegan un papel a favor de la tolerancia del injerto. Sin embargo, hasta la fecha no hay ningún estudio en el que analicen la dinámica de las células B productoras de IL10 en pacientes receptores de un trasplante renal, así como el efecto de las drogas inmunosupresoras sobre ellas.

Este estudio se emprendió para analizar prospectivamente las células B productoras de IL10 en una cohorte de 200 pacientes con ERCA que reciben un trasplante renal. Los objetivos de este estudio son:

1. Determinar las células productoras de IL10 incluidas en el compartimento de células B transicionales en pacientes con ERCA y comparar sus proporciones con las de controles sanos.
2. Evaluar la dinámica de las células B transicionales productoras de IL10 en el post-trasplante.
3. Analizar el efecto de las drogas inmunosupresoras de inducción y de mantenimiento sobre las células IL10⁺Breg.

4. Evaluar la asociación de los niveles de IL10⁺Breg con complicaciones post-trasplante.
5. Analizar la relación de los linfocitos cTfh con las células IL10⁺Breg en el pre- y en el post-trasplante y su asociación con el rechazo del injerto.

CONCLUSIONES

1. Los pacientes con ERCA tienen niveles elevados de células B transicionales e IL10⁺Breg en comparación a controles sanos.
2. Hay una reducción muy significativa de las células IL10⁺Breg en el post-trasplante.
3. El porcentaje elevado de IL10⁺Breg en el pre-trasplante surge como un factor independiente de riesgo para el rechazo agudo del injerto.
4. La caída de la proporción de IL10⁺Breg del pre-trasplante al post-trasplante inmediato también aparece como un factor independiente de riesgo para el desarrollo de rechazo agudo del injerto.
5. Existe una correlación directa entre las células IL10⁺Breg y las cTfh en el pre-trasplante, cuyo ratio se desregula a favor de las cTfh en el post-trasplante.
6. El aumento de la ratio cTfh/IL10⁺Breg en el post-trasplante precede el rechazo agudo del injerto.

PUBLICACIÓN



Imbalance favoring follicular helper T cells over IL10⁺ regulatory B cells is detrimental for the kidney allograft

Rocio Laguna-Goya^{1,2,3,5}, Alberto Utrero-Rico^{1,2,5}, Francisco Luis Cano-Romero^{1,2}, Elena Gómez-Massa^{1,2}, Esther González^{2,4}, Amado Andrés^{2,4}, Esther Mancebo-Sierra^{1,2} and Estela Paz-Artal^{1,2,3}

¹Department of Immunology, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain; ²Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (imas12), Madrid, Spain; ³Department of Immunology, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain; and ⁴Department of Nephrology, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

A high frequency of regulatory B (Breg) cells, generally transitional B cells, has been associated with long-term kidney allograft survival and operational tolerance. However, circulating follicular helper T cells (cTfh) correlate with graft rejection. In order to better understand the interplay between these cell subsets and to determine their association with graft outcome we studied transitional and IL10⁺ Breg cells, as well as cTfh, pre- and post-transplantation in a prospective cohort of 200 kidney transplant recipients and in healthy volunteers. Patients with end-stage kidney disease had higher frequencies of transitional and IL10⁺ Breg cells compared to controls, and these subsets decreased during the one-year post-transplant follow-up. Higher frequencies of pre-transplant IL10⁺ Breg cells, and a larger reduction in these cells early post-transplantation, predicted acute rejection and graft failure. Moreover, IL10⁺ Breg cells correlated with cTfh pre-transplantation, and a post-transplant increase in the cTfh/IL10⁺ Breg ratio preceded acute rejection. Thus, evaluation of pre-transplant IL10⁺ Breg cells and the regular monitoring of the cTfh/IL10⁺ Breg ratio may be useful to assess post-transplant risk. Hence, our observations suggest the need to develop therapeutic strategies aimed at preserving regulatory B cells, and depleting Tfh, post-transplantation.

Kidney International (2020) **98**, 732–743; <https://doi.org/10.1016/j.kint.2020.02.039>

KEYWORDS: acute rejection; graft survival; IL-10⁺ regulatory B cells; kidney transplantation; transitional B cells

Copyright © 2020, International Society of Nephrology. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Correspondence: Alberto Utrero-Rico, Immunology, Hospital Universitario 12 de Octubre Centro de Investigación Biomédica, Madrid 28041, Spain. E-mail: alutero@gmail.com

⁵RLG and AU-R contributed equally to this work.

Received 15 November 2019; revised 18 February 2020; accepted 28 February 2020; published online 20 April 2020

Regulatory B (Breg) cells are important modulators of the immune response and contribute to immune tolerance. Within the Breg cell compartment, different cell phenotypes can be distinguished, all of which are characterized by the production of the anti-inflammatory cytokine interleukin (IL)-10. Most literature published on human Breg cells is based on the study of transitional B cells (CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}), a subset of B cells enriched in IL-10-producing regulatory cells.¹ Transitional B cells have been found to be numerically reduced and/or dysfunctional in autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus,² rheumatoid arthritis,³ and multiple sclerosis,⁴ resulting in deleterious immune effector functions. The first indication that Breg cells may be relevant for transplantation tolerance derives from studies on operational-tolerant patients. These naturally tolerant patients exhibit a particular B cell signature including increased transitional B cells.^{5–7} Cross-sectional studies have associated reduced transitional B cells with renal allograft dysfunction^{8,9} and chronic antibody-mediated rejection¹⁰ and increased transitional B cells with longer duration of graft survival.¹¹ In a prospective cohort, transitional B cells were associated with protection from acute rejection.¹² Despite this body of work, prospective studies analyzing the impact of true IL-10-producing Breg cells on allograft evolution are still lacking.

There are emerging data on the role of Breg cells in controlling follicular helper T cell (Tfh) function and humoral immune responses. Tfh are a subset of T lymphocytes specialized in assisting B cells to produce antibodies in the B cell follicles and have been described as circulating Tfh (cTfh) in peripheral blood.^{13,14} cTfhs have been associated with the development of *de novo* anti-human leukocyte antigen (dnHLA) antibodies¹⁵ and *de novo* donor-specific antibodies¹⁶ and with the development of acute¹⁵ and chronic rejection.^{17,18} Tfh function is mostly regulated by T follicular regulatory cells,^{19–21} but Breg cells have been shown to prevent Tfh development, to expand T follicular regulatory cells, and to inhibit the Tfh-mediated differentiation of plasma cells *in vitro*.²² Based on these data, Breg cells could potentially protect from humoral alloimmune responses and rejection by downregulating Tfh number and/or function.

In this study, we sought to assess the Breg cell compartment in kidney transplant recipients, its association with graft outcome, and the *in vivo* regulation of Breg cells and Tfh. We built a large prospective cohort of 200 kidney recipients and measured transitional and IL-10⁺ Breg cells (transitional B cells with higher IL-10 production capacity after *ex vivo* stimulation), pretransplantation and at 6 time points post-transplantation. We found that (i) higher transitional and IL-10⁺ Breg cells pretransplant, (ii) the reduction of IL-10⁺ Breg cells post-transplant, and (iii) the increase in the cTfh/IL-10⁺Breg ratio post-transplantation correlated with acute kidney rejection and graft failure. These results highlight the interaction between IL-10⁺ Breg cells and cTfhs for the modulation of the immune response against the allograft and suggest that these cell populations could be used as biomarkers as well as therapeutic targets in transplantation.

RESULTS

Characteristics of the kidney recipient cohort

Table 1 shows the main characteristics of the studied cohort. The median age was 56 years and most patients were male, on dialysis, and receiving their first transplant from brain-dead donors. Thirty-seven patients (18.5%) were HLA-sensitized before transplantation and 13 patients (6.5%) developed dnHLA antibodies post-transplantation. Most patients received induction therapy with either basiliximab (42% of recipients) or thymoglobulin (46.5%). Two patients (1%) received induction with rituximab in addition to thymoglobulin. After transplantation, all patients received tacrolimus, mycophenolate mofetil, and glucocorticoids as immunosuppressive maintenance therapy. Twenty-seven patients (13.5%) had a biopsy-proven acute rejection (BPAR) within follow-up. Eighteen (9%) graft failures occurred, at a median of 256 days post-transplantation (range 1–1452 days).

Transitional and IL-10⁺ Breg cells are augmented in patients with ESRD and decrease after transplantation

This study was designed with the aim of measuring Breg cells as IL-10-producing cells, not just as transitional B cells. Following the literature,^{2,9} transitional B cells were defined as CD19⁺CD24⁺CD38⁺ and were divided into transitional 1 (T1) and transitional 2 (T2) subpopulations based on the intensity of CD24 and CD38 (Figure 1a and b). We confirmed that T1 cells, CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}, are enriched for IL-10-producing cells (Figure 1c; Supplementary Figure S1), and next defined IL-10⁺ Breg cells as the IL-10-producing cells within the transitional T1 population (CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}IL10⁺). This latter population is meant to be the one with the greatest regulatory capacity.⁹

Within the B cell compartment pretransplantation, both transitional and IL-10⁺ Breg cells were significantly increased in patients with end-stage renal disease (ESRD) compared with healthy volunteers (HVs) (20% vs. 10% and 1.5% vs. 0.8%, $P < 0.001$ and $P < 0.01$, respectively) (Figure 1d and e). Among patients with ESRD, no association was observed between pretransplantation transitional and IL-10⁺ Breg cells

Table 1 | Clinical characteristics of patients who received renal transplant in the study

Characteristics	Kidney transplant cohort (n = 200)
Recipient age (yr)	56.35 (16.7–83.5)
Male recipient	143 (71.5)
Dialysis prior to transplantation	178 (89)
Days in dialysis	529 (80–9572)
Cause of end-stage renal disease	
Glomerulonephritis ^a	24 (12)
Hypertensive nephrosclerosis	19 (9.5)
Diabetic nephropathy	31 (15.5)
IgA nephropathy	21 (10.5)
Other nephropathy ^b	19 (9.5)
Polycystic kidney disease	26 (13)
Others ^c	38 (19)
Unknown	22 (11)
Previous kidney transplantation	27 (13.5)
Transplant source	
Brain-dead donor	123 (61.5)
Uncontrolled cardiac death donor	28 (14)
Controlled cardiac death donor	23 (11.5)
Living donor	26 (13)
Expanded criteria donor ^d	119 (59.5)
Anti-HLA Abs pretransplantation	37 (18.5)
De novo anti-HLA post-transplantation	13 (6.5)
HLA mismatches	
0–3	56 (28)
4–6	144 (72)
Type of induction therapy	
None	23 (11.5)
Basiliximab	84 (42)
Thymoglobulin	93 (46.5)
Delayed graft function ^e	101 (50.5)
BPAR within 3 years of transplantation	27 (13.5)
Cellular BPAR	17 (8.5)
Cellular + humoral BPAR	4 (2)
Humoral BPAR	6 (3)
Graft failure	18 (9)

Abs, antibodies; BPAR, biopsy-proven acute rejection; HLA, human leukocyte antigen.

^aMembranoproliferative, focal segmental, and other glomerulonephritis.

^bLupus, reflux, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and other nephropathies.

^cVasculitis, amyloidosis, nephronophthisis, and others.

^dDonor > 60 yr old and/or cardiac death.

^eDialysis requirement in the first 2 postoperative wk.

Values are median (range) or n (%).

and clinical variables, such as age, sex, dialysis, previous transfusions and transplants, and pretransplant anti-HLA sensitization. In addition, we completed the study of the B cell compartment and found that ESRD was associated with a decrease in naive B cells, together with an increase in memory B cells, compared with HVs (56% vs. 76% and 11% vs. 7%, $P < 0.001$ and $P = 0.06$, respectively) (Supplementary Figure S2).

Post-transplantation B cell subpopulations were measured prospectively. Transitional and IL-10⁺ Breg cells decreased in the first week post-transplantation and remained low during the 1-year follow-up (Figure 1f and g). Conversely, naive B cell frequencies increased at all times measured post-transplantation, and memory B cell frequencies were increased only during the first month post-transplant (Supplementary Figure S3). These results suggest that

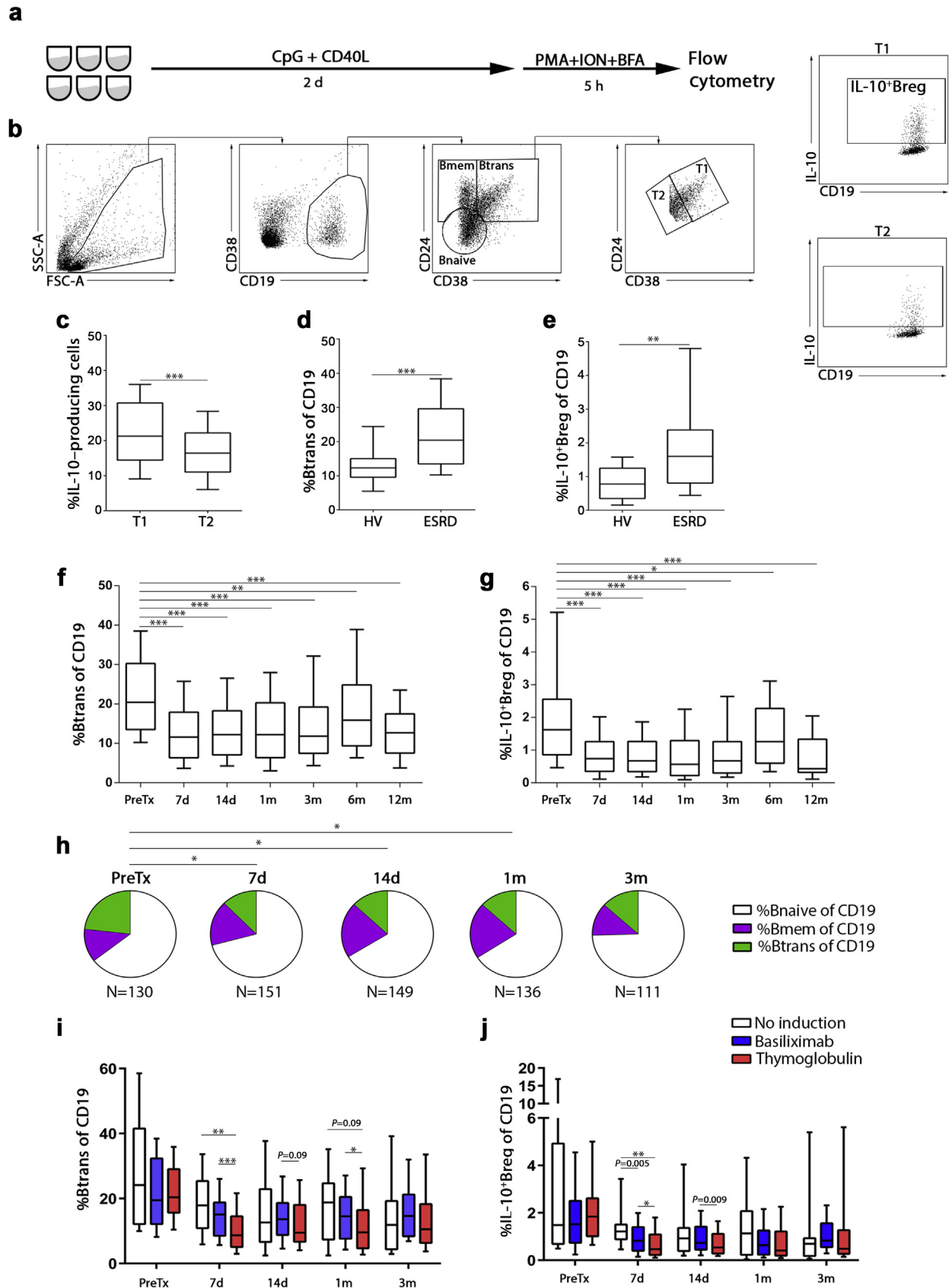


Figure 1 | Transitional and interleukin (IL)-10⁺ regulatory B (Breg) cells are increased in patients with end-stage renal disease (ESRD) and decrease after transplantation in kidney transplant recipients. (a) Protocol for identification of IL-10-producing B cells. (Continued)

currently used immunosuppressive drugs affect the B cell subpopulations differently, producing a drop in transitional and IL-10⁺ Breg cells and an increase in naive and memory B cells early post-transplantation (Figure 1h). Regarding immunosuppressive induction therapies, we observed that the reduction in transitional and IL-10⁺ Breg cells post-transplant was significantly more pronounced in patients treated with thymoglobulin than in patients receiving basiliximab or no induction (Figure 1i and j). This effect of thymoglobulin was not observed in naive or memory B cells (Supplementary Figure S4), suggesting that thymoglobulin selectively depletes transitional and IL-10⁺ Breg cells within the B cell compartment.

Patients with ESRD with higher levels of transitional and IL-10⁺ Breg cells pretransplantation have increased risk of acute rejection and graft failure

Patients who suffered acute rejection ($n = 27$) had similar clinical characteristics as stable patients did, except that patients with BPAR were younger (median age 50.2 vs. 57.4 years, $P < 0.05$) and had a higher proportion of dnHLA antibody development (25.9% vs. 3.5%, $P < 0.001$) (Table 2). We analyzed the association between pretransplant IL-10-producing B cells and acute rejection and found that patients who experienced BPAR had significantly higher pretransplantation frequencies of IL-10⁺ B cells than did patients who remained stable (13.2% vs. 9.2%, $P < 0.05$) (Supplementary Figure S1B), in particular, higher frequencies of transitional and IL-10⁺ Breg cells (26% vs. 20%, $P < 0.05$, and 2.3% vs. 1.5%, $P < 0.01$, respectively) (Figure 2a and b). This association was not found for IL-10⁺ naive or IL-10⁺ memory B cells (Supplementary Figure S1C and D).

After receiver-operating characteristic curve analysis, pretransplant IL-10⁺ Breg cells emerged as a valid predictor of BPAR risk after transplantation, with an area under the curve of 0.72. The median frequency of IL-10⁺ Breg cells pretransplantation (1.62%) was used to divide the cohort into patients with high (>1.62%) and low (<1.62%) Breg cells. Kidney recipients with high IL-10⁺ Breg cells pretransplantation (above the median) had lower BPAR-free survival (78.5% vs. 93.7%, $P < 0.05$) (Figure 2c). These patients had 3.79 times more risk of suffering BPAR (hazard ratio [HR]: 3.79, 95% confidence interval [CI]: 1.25–11.51; $P = 0.02$). Moreover, there was a trend toward higher pretransplant transitional and IL-10⁺ Breg cells in patients

developing dnHLA antibodies post-transplantation (Supplementary Figure S5). Given that there were differences in age and dnHLA antibodies between stable and rejection patients (Table 2), we performed a multivariate analysis to test whether the increased BPAR risk associated with high IL-10⁺ Breg cells pretransplantation could be influenced by these 2 variables (Table 3). In this analysis, dnHLA antibodies (HR: 9.05; 95% CI: 2.72–30.16; $P < 0.001$) and pretransplantation high IL-10⁺ Breg levels (HR: 3.98; 95% CI: 1.27–12.43; $P = 0.02$) appeared as independent risk factors that contribute to rejection.

Regarding overall graft survival, pretransplantation levels of transitional B and IL-10⁺ Breg cells were also significantly higher in patients who lost graft function ($n = 18$) versus patients with functional grafts (30% vs. 20.2%, $P < 0.05$, and 2.3% vs. 1.58%, $P < 0.05$, respectively) (Figure 2d and e). In the case of graft failure, the area under the curve was 0.73. Patients with high IL-10⁺ Breg cells pretransplantation (>1.62%) had lower graft survival (85.2% vs. 98.4%, $P = 0.01$) (Figure 2f). In fact, they had 8.59 times more risk of suffering graft loss during follow-up (HR: 8.59; 95% CI: 1.07–68.76; $P < 0.05$). Both patient groups had similar clinical characteristics except for the appearance of dnHLA antibodies ($P < 0.001$) and delayed graft function ($P = 0.09$) in recipients with failed transplants (Table 2). Multivariate Cox regression showed that both dnHLA antibodies (HR: 16.52; 95% CI: 3.65–74.88; $P < 0.001$) and pretransplantation high IL-10⁺ Breg levels (HR: 13.46; 95% CI: 1.53–118.18; $P = 0.02$) are independent risk factors that contribute to graft loss (Table 3).

All of these findings support the suitability of pretransplant IL-10⁺ Breg frequency as an early biomarker for acute rejection and graft failure, allowing the identification of patients who are at higher risk of these adverse events post-transplantation.

The reduction in transitional and IL-10⁺ Breg cells early post-transplantation is associated with acute rejection and graft failure

To explain the apparent contradiction of tolerogenic IL-10⁺ Breg cells being higher pretransplantation in patients who subsequently rejected, we hypothesized that patients with BPAR may have experienced a greater loss of IL-10⁺ Breg cells early post-transplant. This drop in IL-10⁺ Breg cells could produce a shift from a protolerogenic toward a proalloreactive

Figure 1 | (Continued) **(b)** Flow cytometry of IL-10-producing B cells. Transitional B cells (Btrans) were identified as CD19⁺CD24⁺CD38⁺, memory B cells (Bmem) as CD19⁺CD24⁺CD38⁻, and naive B cells (Bnaive) as CD19⁺CD24⁻CD38⁻. Transitional B cells were divided into T1 (CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}) and T2 (CD19⁺CD24^{int}CD38^{int}) cells. IL-10 was labeled intracellularly, allowing the identification of IL-10⁺ Breg cells (CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}IL10⁺). **(c)** T1 fraction has the largest frequency of IL-10-producing cells within transitional B cells. Patients with ESRD had higher levels of **(d)** transitional and **(e)** IL-10⁺ Breg cells than healthy volunteers (HVs) did. **(f)** Transitional and **(g)** IL-10⁺ Breg cells decreased post-transplantation and remained low throughout the 1-year follow-up. **(h)** Proportions of naive, memory, and transitional B cells were significantly different during the first month post-transplant. **(i)** Transitional and **(j)** IL-10⁺ Breg cells decreased in all recipients post-transplantation, but patients treated with thymoglobulin had the lowest levels of these cells. **(f–j)** Days and months are post-transplant. **(c–g,i,j)** Mann-Whitney *U* test; **(h)** 2-way analysis of variance. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. BFA, brefeldin A; CpG, 5'-C-phosphate-G-3'; FSC-A, forward scatter-area; ION, ionomycin; PMA, phorbol myristate acetate; PreTx, pretransplantation; SSC-A, side scatter-area; T1, transitional 1 B cells; T2, transitional 2 B cells.

Table 2 | Comparison of clinical characteristics between patients with or without BPAR and patients with or without graft failure

Clinical characteristics	Stable patients (n = 173)	BPAR patients (n = 27)	P value	Graft survival (n = 181)	Graft failure (n = 18)	P value
Recipient age (yr)	57.4 (16.7–83.5)	50.2 (21.4–79.9)	^f	56.3 (16.7–83.5)	58.6 (21.4–81.3)	0.28
Male recipient	122 (70.5)	21 (77.8)	0.58	130 (71.4)	12 (66.7)	0.85
Dialysis prior to transplantation	154 (89)	24 (88.9)	1.00	161 (88.5)	16 (88.9)	1.00
Days in dialysis	527 (80–9572)	575 (171–2863)	0.96	515 (80–9114)	1034 (174–9572)	0.14
Cause of end-stage renal disease			0.55			0.29
Glomerulonephritis ^a	20 (11.6)	4 (14.8)		19 (10.5)	5 (27.8)	
Hypertensive nephrosclerosis	16 (9.2)	3 (11.1)		16 (8.9)	3 (16.6)	
Diabetic nephropathy	29 (16.8)	2 (7.4)		29 (16)	2 (11.1)	
IgA nephropathy	19 (11)	2 (7.4)		20 (11)	1 (5.6)	
Other nephropathies ^b	16 (9.2)	3 (11.1)		19 (10.5)	0 (0)	
Polycystic kidney disease	22 (12.7)	4 (14.8)		24 (13.3)	1 (5.6)	
Others ^c	36 (20.8)	2 (7.4)		36 (19.9)	2 (11.1)	
Unknown	15 (8.7)	7 (26)		18 (9.9)	4 (22.2)	
Previous kidney transplantation	23 (13.3)	4 (14.8)	1.00	24 (13.3)	3 (16.7)	0.97
Transplant source			0.41			0.39
Brain-dead donor	107 (61.8)	16 (59.3)		110 (60.8)	13 (72.2)	
Uncontrolled cardiac death donor	23 (13.3)	5 (18.5)		25 (13.8)	3 (16.7)	
Controlled cardiac death donor	22 (12.7)	1 (3.7)		20 (11)	2 (11.1)	
Living donor	21 (12.2)	5 (18.5)		26 (14.4)	0 (0)	
Expanded criteria donors ^d	106 (61.3)	13 (48.1)	0.21	105 (58)	13 (72.2)	0.32
Anti-HLA Abs pretransplantation	31 (17.9)	6 (22.2)	0.79	32 (17.7)	5 (27.8)	0.51
De novo anti-HLA Abs post-transplantation	6 (3.5)	7 (25.9)	^g	7 (3.9)	6 (33.3)	^g
HLA mismatches			0.86			0.79
0–3	50 (28.9)	6 (22.2)		53 (29.3)	3 (16.7)	
4–6	123 (71.1)	21 (77.8)		128 (70.7)	15 (83.3)	
Type of induction therapy			0.78			0.94
None	19 (11)	4 (14.8)		21 (11.6)	2 (11.1)	
Basiliximab	74 (42.8)	10 (37)		77 (42.5)	7 (38.9)	
Thymoglobulin	80 (46.2)	13 (48.2)		83 (45.9)	9 (50)	
Delayed graft function ^e	87 (50.3)	14 (51.9)	1.00	87 (48)	13 (72)	0.09

Abs, antibodies; BPAR, biopsy-proven acute rejection; HLA, human leukocyte antigen.

^aMembranoproliferative, focal segmental, and other glomerulonephritis.

^bLupus, reflux, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and other nephropathies.

^cVasculitis, amyloidosis, nephronophthisis, and others.

^dDonor > 60 yr old and/or cardiac death.

^eDialysis requirement in the first 2 postoperative wk.

^fP < 0.05.

^gP < 0.001.

Values are median (range) or n (%).

environment post-transplant, which would favor allor-cognition of the graft. The difference in IL-10⁺ Breg cells between pretransplant and day 7 post-transplant was calculated for each patient, and it was significantly greater for IL-10⁺ Breg than for IL-10⁺ naive or IL-10⁺ memory B cells (P < 0.001) (Supplementary Figure S1E). As hypothesized, a larger reduction in IL-10⁺ Breg cells in the first week post-transplantation was found in rejectors versus nonrejectors (P < 0.05) (Figure 3). This association was not found with the reduction in IL-10⁺ naive or IL-10⁺ memory B cells (Supplementary Figure S1F and G).

Patients were divided into those with a reduction in IL-10⁺ Breg cells in the first week post-transplant above the median (>0.85%) and those with a reduction below the median (<0.85%). Those patients with a higher reduction in IL-10⁺ Breg cells post-transplant (>0.85%) had a lower BPAR-free survival (76.9% vs. 92.5%, P < 0.05) (Figure 3c), with a 3.3 times increased risk of experiencing BPAR post-transplantation (HR: 3.3; 95% CI: 1.07–10.25; P = 0.04).

Multivariate Cox regression showed that both dnHLA antibodies (HR: 7.98; 95% CI: 2.11–30.25; P < 0.01) and post-transplant reduction in IL-10⁺ Breg cells (HR: 3.63; 95% CI: 1.12–11.74; P = 0.03) are independent risk factors that contribute to acute rejection (Table 3).

The decrease in transitional and IL-10⁺ Breg cells from pretransplant to post-transplant was also higher in patients who lost their graft function, although not statistically different (Figure 3d and e). Kidney recipients with a greater drop in IL-10⁺ Breg cells post-transplant (>0.85%) had lower graft survival (84.2% vs. 96.2%, P = 0.07) (Figure 3f). In fact, patients with a larger reduction in IL-10⁺ Breg cells had 3.79 times more risk of developing graft failure post-transplantation (HR: 3.79; 95% CI: 0.79–18.26; P = 0.096). Multivariate Cox regression showed that both dnHLA antibodies (HR: 13.47; 95% CI: 3.15–57.57; P < 0.001) and reduction in IL-10⁺ Breg cells (HR: 5.86; 95% CI: 1.10–31.30; P < 0.05) appeared as independent risk factors that contribute to graft failure (Table 3).

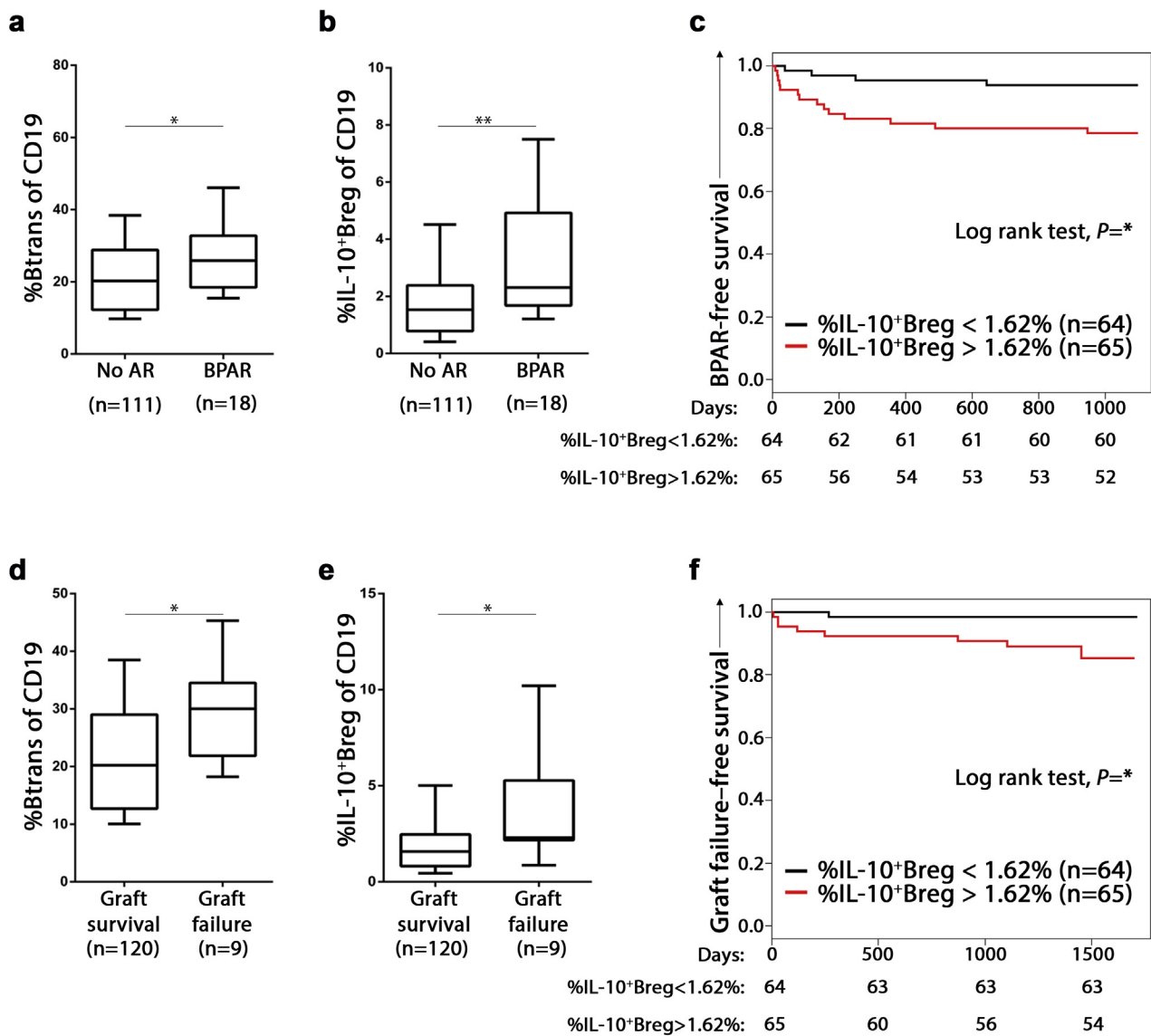


Figure 2 | Acute rejection (AR) and graft failure correlated with higher pretransplant levels of interleukin (IL)-10⁺ regulatory B (Breg) cells. Higher levels of (a) transitional B cells (Btrans) (CD19⁺CD24⁺CD38⁺) and (b) IL 10⁺ Breg (CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}IL10⁺) cells pretransplantation were measured in patients who suffered biopsy-proven acute rejection (BPAR) than in stable patients who did not reject (No AR). (c) Patients with high pretransplant levels of IL-10⁺ Breg cells (i.e., above the median) had lower BPAR-free survival. Patients who suffered graft failure had also higher levels of (d) transitional and (e) IL-10⁺ Breg cells pretransplantation than did patients with functional graft. (f) Patients with high pretransplant levels of IL-10⁺ Breg cells (i.e., above the median) had lower graft failure-free survival. (a,b,d,e) Mann-Whitney *U* test; (c,f) Kaplan-Meier method and log rank test. Patients at risk are indicated at each time point. **P* < 0.05; ***P* < 0.01.

We finally aimed to test the finding of Cherukuri *et al.*⁹ showing that a low post-transplant T1-T2 cell ratio (IL-10-impoverished environment) predicted graft dysfunction. In our cohort, we did not find differences in T1-T2 ratio post-transplantation (data not shown). Pretransplantation T1-T2 ratio was higher in patients who subsequently suffered rejection (0.78 vs. 0.67, *P* = 0.09) or graft failure (1.09 vs. 0.69, *P* = 0.07), but not significantly different. Pretransplant T1 cell frequencies were also higher in patients subsequently suffering BPAR (10.96% vs. 7.42%, *P* < 0.05) and graft failure (15.6% vs. 7.52%, *P* < 0.05), which reinforces the idea that allograft outcome mostly depends on early modifications of

the IL-10⁺ Breg-enriched T1 cells and further suggests that the pretransplant IL-10⁺ Breg proportion could be used to stratify kidney transplant recipients in high- and low-risk patients.

Post-transplant increase in the cTfh/IL-10⁺ Breg ratio preceded acute rejection

We have previously described the association between cTfhs and HLA sensitization and acute rejection in renal recipients.¹⁵ Here we aimed to understand the relationship between IL-10⁺ Breg cells and cTfhs in patients who have received kidney transplants. Levels of these 2 cell populations

Table 3 | Univariate and multivariate hazard ratio analysis using Cox regression models

Variable	Crude HR (95% CI)	P value	Adjusted HR (95% CI)	Adjusted P value
Pretransplant IL10⁺ Breg and BPAR				
Age	0.98 (0.96–1.00)	0.07	—	—
De novo anti-HLA Abs post-tx (yes)	6.97 (2.93–16.55)	^a	9.05 (2.72–30.16)	^a
%IL10 ⁺ Breg of CD19 pre-tx (>1.625%)	3.79 (1.25–11.51)	^b	3.98 (1.27–12.43)	^b
Pre- to post-transplant reduction of IL10⁺Breg and BPAR				
Age	0.98 (0.96–1.00)	0.07	—	—
De novo anti-HLA Abs post-tx (Yes)	6.97 (2.93–16.55)	^a	7.98 (2.11–30.25)	^c
Pre- to post-transplant reduction of %IL10 ⁺ Breg (>0.85%)	3.30 (1.07–10.25)	^b	3.63 (1.12–11.74)	^b
Pretransplant IL10⁺ Breg and graft failure				
Delayed graft function (yes)	2.74 (0.98–7.68)	0.06	—	—
De novo anti-HLA Abs post-tx (yes)	9.44 (3.52–25.33)	^a	16.52 (3.65–74.88)	^a
%IL10 ⁺ Breg of CD19 pre-tx (>1.625%)	8.59 (1.07–68.76)	^b	13.46 (1.53–118.18)	^b
Pre- to post-transplant reduction of IL10⁺Breg and graft failure				
Delayed graft function (yes)	2.74 (0.98–7.68)	0.06	—	—
De novo anti-HLA Abs post-tx (yes)	9.44 (3.52–25.33)	^a	13.47 (3.15–57.57)	^a
Pre- to post-transplant reduction of %IL10 ⁺ Breg (>0.85%)	3.79 (0.79–18.26)	0.09	5.86 (1.10–31.30)	^b

^aP < 0.001.^bP < 0.05.^cP < 0.01.

positively correlated pretransplantation ($r = 0.28$, $P < 0.01$) (Figure 4a). We calculated the cTfh/IL-10⁺ Breg ratio at all time points after transplantation, to evaluate the balance between these 2 cell types and its effect on graft outcome. Pretransplantation, the median cTfh/IL-10⁺ Breg ratio was 0.52 (Figure 4b). Lower ratios would mean that there were proportionally more IL-10⁺ Breg cells than cTfhs and would correspond to a more tolerogenic environment, while higher ratios would represent predominant effector functions of cTfhs. Post-transplantation, the cTfh/IL-10⁺ Breg ratio progressively increased from 0.52 to a ratio close to 2.5 at 6 months post-transplant ($P < 0.001$) (Figure 4b).

The analysis of the effect of cTfh/IL-10⁺ Breg ratio on long-term transplant survival was hindered by the fact that pre- and post-transplant measurements of these cell subsets were only available for 3 patients with graft failure. Regarding acute rejections, most of them occurred within the first 3 months post-transplantation. In the rejection group, we took into account the patients ($n = 18$) for whom we had cTfh and IL-10⁺ Breg measurements both pretransplantation and just prior to acute rejection (maximum 1 month before the BPAR episode). We compared them with stable patients ($n = 50$) for whom we had the cell measurements pretransplantation and 14 days post-transplantation. Overall, the cTfh/IL-10⁺ Breg ratio increased between pre- and post-transplant in patients with BPAR (from 0.3 to 1.6, $P < 0.01$) (Figure 4c) and in stable patients (from 0.6 to 0.9, $P < 0.001$) (Figure 4d). In a further analysis, patients were divided into those whose cTfh/IL-10⁺ Breg ratio increased post-transplantation and those for whom the ratio decreased. The cTfh/IL-10⁺ Breg ratio increased in all 18 patients (100%) who had BPAR, but only in 38 of 50 of stable patients (76%, $P < 0.05$) (Figure 4e). No patient experiencing BPAR showed a decreasing ratio post-transplantation. Moreover, the increase in the cTfh/IL-10⁺ Breg ratio was significantly greater in patients who

experienced BPAR than in stable patients ($P < 0.05$) (Figure 4f). This result was not influenced by differences in thymoglobulin treatment (which strongly affects cTfh and Breg cells), as induction therapy was similar between patients with BPAR and those who are stable (Table 2). This relationship between cTfh and IL-10⁺ Breg cells was supported by a trend toward higher post-transplant cTfh-IL-10⁺ Breg ratio in patients developing dnHLA antibodies (Supplementary Figure S6A) and, most importantly, by the association found between cTfh/IL10⁺ Breg ratio and humoral BPAR (Supplementary Figure S6B).

In summary, an increase in cTfh/IL-10⁺ Breg ratio from pre- to post-transplant associated with a higher risk of BPAR, thus the imbalance in favor of cTfh versus IL-10⁺ Breg cells seems to be relevant in enhancing the alloresponse against the graft.

DISCUSSION

Whereas Breg cells have been previously proposed as beneficial for renal graft outcome, cTfhs have been associated with HLA sensitization and graft rejection. Here we aimed to better understand the interplay between Breg and cTfh, cell subsets of increasing interest in transplantation, and its effect on the kidney allograft.

Breg cells are a minority cell population that contributes to the maintenance of immune tolerance through the production of IL-10 among other mechanisms. One of the strengths of this study is that it is the first kidney transplant cohort to prospectively measure not only transitional (CD19⁺CD24⁺CD38⁺) B cells, but also IL-10 production (CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}IL10⁺ cells, defined as IL-10⁺ Breg cells), pre- and post-transplantation. Cherukuri *et al.*⁹ described a transitional B cell T1-T2 ratio, measured at 2 years post-transplantation, which was associated with subsequent renal graft function deterioration, and proposed this

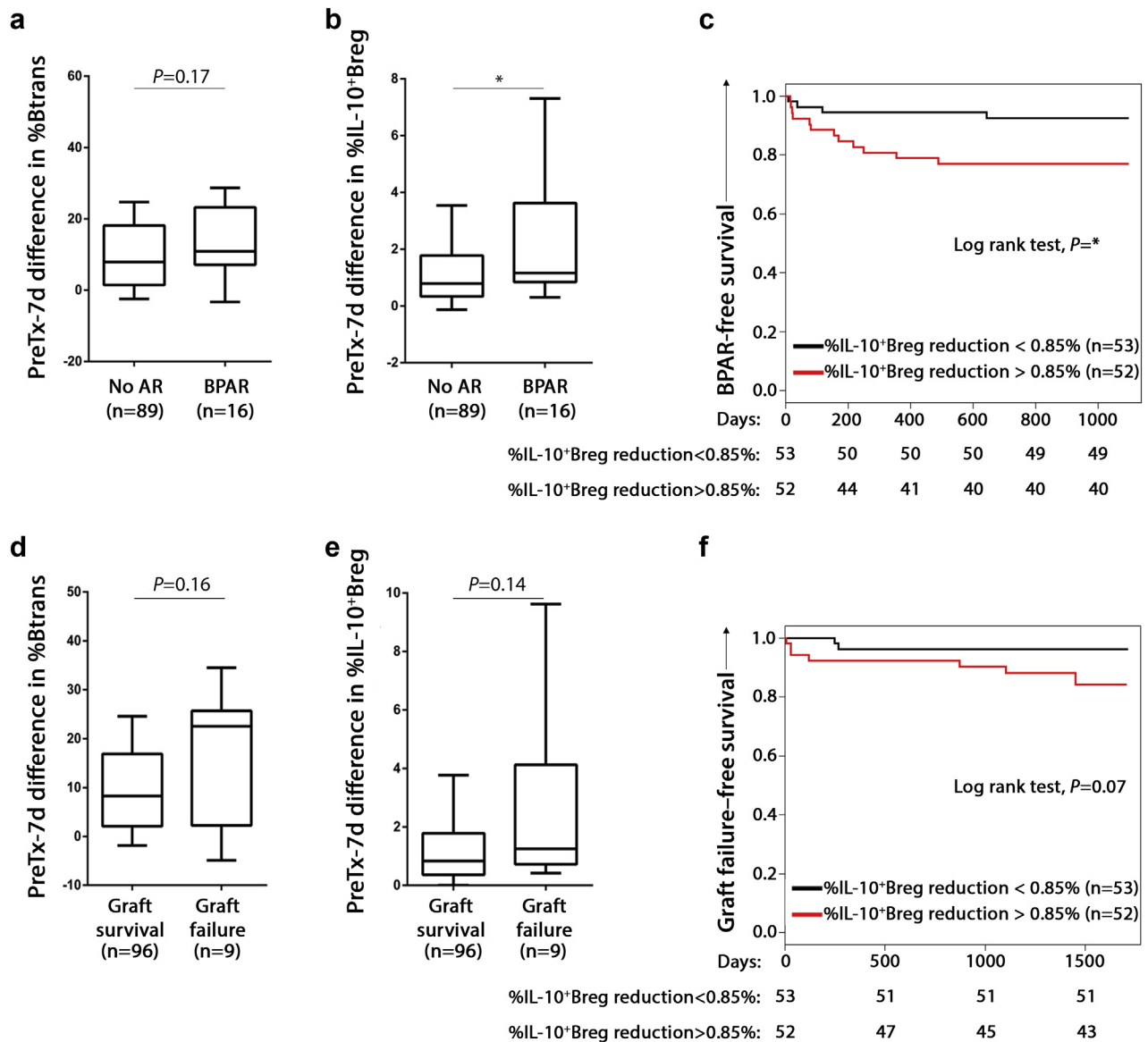


Figure 3 | A greater reduction in interleukin (IL)-10⁺ regulatory B (Breg) levels between pre- and post-transplantation correlated with biopsy-proven acute rejection (BPAR) and graft loss. (a,b) The reduction from pretransplant (PreTx) to day 7 post-transplant in IL-10⁺ Breg (CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}IL10⁺) cells was higher in patients who suffered BPAR than in stable patients; there was also a trend toward higher reduction in transitional (CD19⁺CD24⁺CD38⁺) B cells in patients with BPAR. **(c)** Patients with high PreTx-day 7 reduction IL-10⁺ Breg cells (i.e., above the median) had lower BPAR-free survival. The PreTx-day 7 reduction in **(d)** transitional B (transB) and **(e)** IL-10⁺ Breg cells levels was higher in patients who lost graft function post-transplant than in those who maintained graft function, although it was not statistically different. **(f)** Patients with high PreTx-day 7 reduction IL-10⁺ Breg cells (i.e., above the median) had lower graft failure-free survival. **(a,b,d,e)** Mann-Whitney *U* test; **(c,f)** Kaplan-Meier method and log rank test. Patients at risk are indicated at each time point. **P* < 0.05. AR, acute rejection.

ratio as a prognostic marker in transplantation that would not require the intracellular labeling of IL-10. However, we could not replicate similar results using the T1-T2 ratio at earlier post-transplant time points, and while low T1 cells showed a trend toward association with development of anti-HLA antibodies and acute rejection in our study (data not shown), we found a stronger correlation between IL-10⁺ Breg and transplant outcome. Thus, measuring IL-10⁺ Breg cells, which have the potential to produce IL-10 *in vivo*, can add valuable information for patient monitoring.

Pretransplantation, transitional, and IL-10⁺ Breg cells were increased in patients with ESRD compared with in controls (Figure 1). While we could not discern the exact reason behind this increase, as it was not related to age, dialysis, anti-HLA sensitization, or other clinical variables collected in this study, ESRD is a proinflammatory state^{23,24} and Breg cells could be upregulated in patients with ESRD in an attempt to compensate for this inflammatory environment. Besides, memory B cell frequencies were also increased in patients with ESRD while naive B cell frequencies were decreased. This

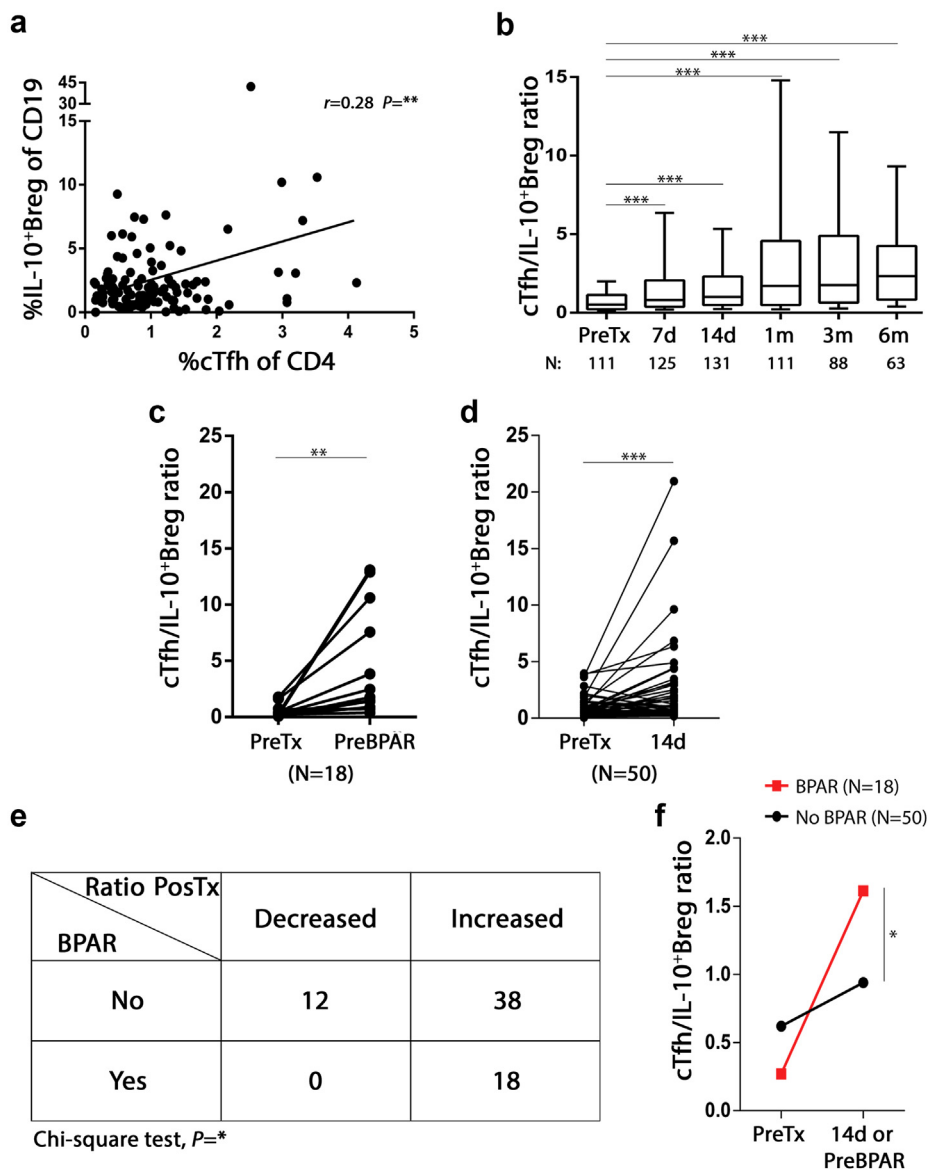


Figure 4 | The circulating follicular helper T (cTfh)/interleukin (IL)-10⁺ regulatory B (Breg) ratio increased post-transplantation (PosTx), and a higher increase in this ratio preceded biopsy-proven acute rejection (BPAR). (a) Pretransplant (PreTx) frequencies of IL-10⁺ Breg (CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}IL10⁺) cells positively correlated with pretransplant levels of cTfh (CD4⁺CXCR5⁺PD1^{high}CCR7^{low} cells). (b) The cTfh/IL-10⁺Breg ratio gradually increased after transplantation. Days and months are post-transplant. (c) The cTfh/IL-10⁺Breg ratio increased in all rejection patients prior to the BPAR episode, compared to pretransplant. The PreBPAR ratio measurement corresponds to the ratio prior to BPAR when this was available close to the BPAR date, no more than 1 month in advance. Therefore, these PreBPAR ratio measurements are from 7 days, 14 days, or 1 month post-transplant. (d) The cTfh/IL-10⁺ Breg ratio increased in some stable patients and decreased in others, within the first 2 weeks post-transplantation. (e) The cTfh/IL-10⁺ Breg ratio increased in all patients with acute rejection (PreTx to PreBPAR), while it only increased in 38 of 50 of the stable patients (76%). (f) The post-transplant increase in the cTfh/IL-10⁺ Breg ratio was higher in patients who subsequently suffered rejection than in stable patients. (a) Simple regression and Pearson coefficient; (b,e) Mann-Whitney *U* test; (c,d) Wilcoxon signed-rank test; (e) Fisher’s exact test. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001.

modified distribution within the B cell compartment in patients with ESRD compared with in HVs could also be related to the situation of uremia, which is known to alter immune cell compartments in different ways.^{25,26}

After transplantation, transitional and IL-10⁺ Breg cells decreased (Figure 1) (following a pattern similar to that observed in transitional B cells by Shabir *et al.*¹²), while naive and memory B cells increased (Supplementary Figure S3). These changes in the relative composition of the B cell

compartment could have consequences in the immune response against the allograft, as specific B cell signatures have been associated with transplant tolerance⁷ and chronic kidney injury.²⁷ All kidney recipients in our cohort received the same immunosuppressive maintenance therapy, with tacrolimus, mycophenolate mofetil, and glucocorticoids, which did not allow us to discern the specific effect of each drug on the B cells. However, the decrease in transitional and IL-10⁺ Breg cell frequencies post-transplantation is consistent with a

previous study, which demonstrates that prednisone reduced transitional B cells in a dose-dependent manner.²⁸ Similarly, the cross-sectional study by Latorre *et al.*¹¹ describes a significant depletion of transitional and IL-10⁺ Breg cells in transplant patients treated with calcineurin or mammalian target of rapamycin inhibitors compared with in HVs. As for induction therapies, thymoglobulin clearly reduced transitional and IL-10⁺ Breg frequencies in this study. This is different to the effect of thymoglobulin on regulatory T cells, which have been shown to be preserved in patients treated with thymoglobulin^{29,30} and expanded in animal models of transplantation with the same drug.³¹ Also relevant is the effect on regulatory populations of B cell-depleting therapies, such as rituximab, which are increasingly more used in autoimmunity and transplantation. Rituximab depletes all B cell subsets including transitional and IL-10⁺ Breg cells, and this effect should be taken into account when designing desensitization or antibody-mediated rejection treatment protocols, as it could secondarily favor cellular rejection.³² In our cohort, 2 patients who were transplanted with donor-specific antibodies received induction treatment with rituximab, which could magnify the reduction in IL-10⁺ Breg cells from pre- to post-transplant. However, the association found between the post-transplant drop in IL-10⁺ Breg cells and BPAR (Figure 3b) was not influenced by rituximab, as this drop was larger in the BPAR group and these patients treated with rituximab belong to the stable group.

In this study, pretransplantation high IL-10⁺ Breg cell frequencies (above the median) have appeared as an independent risk factor for acute rejection and graft failure (Table 3). Similar results were obtained using the cutoff calculated by receiver-operating characteristic curve analysis (data not shown); however, we propose the median IL-10⁺ Breg frequency as a parameter that can be easier to apply in other clinical laboratories than a specific cutoff value. Contrarily, Shabir *et al.*¹² observed that nonrejector patients displayed higher transitional B cell frequencies pre- and post-transplantation; however, their patient cohort was ethnically more diverse, and in their study transitional B cells were gated differently and frozen peripheral blood mononuclear cells were analyzed. Nevertheless, both the study by Shabir *et al.*¹² and the current study agree that the Breg decrease after transplantation favors alloreactivity. Our study also confirmed the well-known correlation between dnHLA antibodies and adverse transplant outcomes,^{33,34} which validates the newly found associations.

We hypothesized that expanded Breg cells pretransplantation could indicate an increased need for immune regulation in specific patients. Altering the immune effector-regulatory balance post-transplantation, as a consequence of immunosuppression, could alter the frequencies of T and B lymphocyte subpopulations and favor graft allorrecognition. Consistent with this hypothesis, the reduction in IL-10⁺ Breg cells from pretransplant to 7 days post-transplant also emerged as an independent risk factor for acute rejection and graft failure (Table 3).

Finally, a correlation between IL-10⁺ Breg cells and cTfhs was observed in patients with ESRD (Figure 4). This supports the idea that there could be an interaction between these cell populations *in vivo*, similar to that observed *in vitro*.²² In this patient cohort, a higher increase in the cTfh/IL-10⁺ Breg ratio post-transplantation correlated with acute rejection, suggesting that an imbalance between cTfh and IL-10⁺ Breg cells could promote cTfh activity and rejection. IL-10⁺ Breg cell mechanisms to regulate cTfhs might include, but not be restricted to, expansion of T follicular regulatory cells, production of soluble IL-10 and transforming growth factor β , which have been shown to modulate IL-21 and CXCR5 chemokine receptor 5 (CXCR5) expression on Tfh,²² and elevated surface expression of programmed cell death ligand 1.^{34–36} However, our finding comes from the observation of these 2 cell populations in peripheral blood, and further studies on these cells at the lymph nodes or the graft itself would be useful to better understand their interaction. Finally, all of these findings come from a single-center cohort. Validation of these results in an independent cohort is needed.

In summary, measurements of pretransplantation IL-10⁺ Breg cells can be a useful biomarker to determine kidney recipients that are at high risk of acute rejection and graft loss and to allow personalized therapeutic strategies. Post-transplantation, IL-10⁺ Breg cells decrease and the cTfh/IL10⁺Breg ratio increases in the recipients. Both of these changes are more pronounced in patients with rejection or graft failure, suggesting that these modifications in the immune-regulatory balance post-transplantation have a detrimental effect on the graft. Consequently, new immunosuppressive therapies that would promote IL-10⁺ Breg cells, while eliminating effector cells such as Tfh, should be developed.

METHODS

Study participants

We included all renal transplant recipients, excluding combined transplants, between November 1, 2014, and June 30, 2016, at Hospital 12 de Octubre ($N = 200$). This cohort was prospectively followed for 1-year post-transplantation. Only for-cause biopsies were performed. Rejections were defined as BPAR according to the 2013 Banff classification.³⁷ Clinical data were collected for 1-year post-transplantation, diagnosis of BPAR was followed up for 3 years post-transplantation, and graft failure data was collected for 4 years post-transplantation. Patients who did not experienced BPAR were considered stable patients. Fifteen age- and sex-matched HVs were recruited. Patients and controls signed a written informed consent. The study (PIE13/00045) was approved by the institutional Medical Ethical Committee.

B-cell culture for IL-10 production and Breg cell phenotyping by flow cytometry

Blood samples were prospectively taken pretransplantation and at days 7 and 14 and months 1, 3, 6, and 12 post-transplantation. Pretransplant samples were taken on the day of transplant, prior to induction treatment, and were analyzed within 12 hours of blood withdrawal. The available samples at each time point have been studied and the total number in every analysis is specified in the

figures. The loss of samples at each time point was random and evenly distributed within clinical and demographic patient groups.

For B cell phenotyping, 1.2×10^6 peripheral blood mononuclear cells were plated in culture medium with the stimuli 5'-C-phosphate-G-3' (10 µg/ml; InvivoGen, San Diego, CA) and CD40L (1 µg/ml; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) for 48 hours⁸ (Figure 1a). Five hours prior to the analysis of the cells by flow cytometry, phorbol myristate acetate (50 ng/ml), ionomycin (1 µg/ml), and brefeldin A (5 µg/ml; all from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were added to the culture. The harvested cells were stained with monoclonal antibodies: CD19-PC7 (Beckman Coulter, Brea, CA), CD24-APC (eBioscience, San Diego, CA), and CD38-PerCP-Cy5.5 (BD Bioscience, San Jose, CA) and with intracellular anti-IL10-PE (Miltenyi Biotec). Cells were acquired using a BD Canto II cytometer and results were analyzed with FlowJo V10 (BD, Franklin Lakes, NJ). Transitional B cells were identified as CD19⁺CD24⁺CD38⁺ and IL-10⁺ Breg cells as CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}IL10⁺ (Figure 1b).

cTfh phenotyping by flow cytometry

cTfhs were measured at the same time points as B cells. In brief, fresh peripheral blood mononuclear cells were labeled with monoclonal antibodies: CD4 FITC, CXCR5 APC, CCR7 PerCP-Cy5.5 (all BD Bioscience), and PD1 PE (eBioscience). cTfhs were identified as CD4⁺CXCR5⁺PD1^{high}CCR7^{low} (Supplementary Figure S7) (see methods in by Cano-Romero *et al.*¹⁵).

Detection of anti-HLA antibodies

Anti-HLA antibody screening was performed in all patients pre- and post-transplantation in fresh serum samples using Luminex Technology, as described in by Cano-Romero *et al.*¹⁵

Statistical analysis

Nonparametric Mann-Whitney *U* test was used to compare between 2 groups. For comparison of cell proportions, we used 2-way analysis of variance. We calculated Pearson correlation coefficient and performed simple regression to test association. Pre- and post-transplant measurements of the same patient were evaluated with Wilcoxon signed-rank test. Group distributions were compared using Fisher exact test. Cox regression was used to calculate univariate and multivariate HR with 95% CI and days from transplantation to BPAR or graft failure were taken into account. To test BPAR or graft failure-free survival in the follow-up, we used Kaplan-Meier and log rank test. Statistical analysis was performed using R (R Foundation, Vienna, Austria). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

DISCLOSURE

All the authors declared no competing interests.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by projects to EPA from Instituto de Salud Carlos III (PIE13/00045 and PI17/1630), cofinanced by Fondo Europeo de Desarrollo Regional, and from Sociedad Madrileña de Trasplante (PI17/082).

We thank Paloma Talayero and David Lora for their technical help. We also thank all patients, nurses, and medical colleagues who contributed to the study.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary File (PDF)

Figure S1. IL-10⁺ naive and IL-10⁺ memory B cells had no association with BPAR or graft failure. (A) Pretransplant naive and memory B cells

expressed IL-10 in lower proportion than T1 cells (IL-10⁺ T1 cells correspond to IL-10⁺ Breg cells) ($P < 0.001$). (B) Patients who experienced BPAR had higher pretransplant frequencies of IL-10⁺ B cells than stable patients ($P < 0.05$), while no differences were found between patients with graft survival or failure. (C) No association was found between IL-10⁺ naive B cells and BPAR or graft failure. (D) No association was found either between IL-10⁺ memory B cells and BPAR or graft failure. (E) IL-10⁺ T1 cells (named IL-10⁺ Breg cells) experienced the largest post-transplant reduction of all IL-10⁺ B cell subsets ($P < 0.001$). (F,G) Post-transplant changes in IL-10⁺ naive IL-10⁺ memory B cells did not correlate with BPAR or graft failure.

Figure S2. ESRD patients had lower levels of Bnaive and higher levels of Bmem than healthy controls did. Comparison of (A) Bnaive and (B) Bmem frequencies between ESRD patients and HVs. HV, healthy volunteers; ESRD, end-stage renal disease. (A,B) Mann-Whitney *U* test. *** $P < 0.001$.

Figure S3. Bnaive were increased during the first year post-transplant while Bmem were elevated during the first month post-transplant only. One follow-up year of (A) Bnaive and (B) Bmem. PreTx, pretransplantation; 7d, day 7 post-transplant; 14d, day 14 post-transplant; 1m, month 1 post-transplant; 3m, month 3 post-transplant; 6m, month 6 post-transplant; 12m, month 12 post-transplant. (A,B) Mann-Whitney *U* test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Figure S4. Effect of induction therapy on Bnaive and Bmem. Follow-up of (A) Bnaive and (B) Bmem stratifying kidney recipients according to the induction therapy received. PreTx, pretransplantation; 7d, day 7 post-transplant; 14d, day 14 post-transplant; 1m, month 1 post-transplant; 3m, month 3 post-transplant. (A,B) Mann-Whitney *U* test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Figure S5. Patients who developed *de novo* anti-HLA antibodies post-transplant had higher levels of transitional and IL-10⁺ Breg cells before transplantation. Frequencies of (A) transitional and (B) IL-10⁺ Breg cells pretransplantation were higher in patients who developed *de novo* anti-HLA antibodies post-transplant (-/+) than in those who did not (-/-). (A,B) Mann-Whitney *U* test.

Figure S6. Increased post-transplant cTfh/IL-10⁺ Breg ratio associated with humoral allograft response. (A) At 1-month post-transplant, there was a trend toward higher cTfh/IL-10⁺ Breg ratio in patients who were going to develop *de novo* anti-HLA antibodies in the first year post-transplant (gray bars) compared to those who were not going to develop antibodies (white bars) ($P = 0.17$). (B) The cTfh/IL-10⁺ Breg ratio prior to acute rejection was significantly higher in patients subsequently diagnosed of humoral BPAR compared to patients diagnosed of cellular BPAR ($P < 0.05$).

Figure S7. cTfh identification by flow cytometry in KTR. cTfhs were identified as CD4⁺CXCR5⁺ PD1^{high}CCR7^{low} cells.¹⁵

REFERENCES

- Oleinika K, Mauri C, Salama AD. Effector and regulatory B cells in immune-mediated kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2019;15: 11–26.
- Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, et al. CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic lupus erythematosus patients. *Immunity.* 2010;32: 129–140.
- Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, et al. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci Transl Med.* 2013;5:173ra123.
- Knippenberg S, Peelen E, Smolders J, et al. Reduction in IL-10 producing B cells (Breg) in multiple sclerosis is accompanied by a reduced naive/memory Breg ratio during a relapse but not in remission. *J Neuroimmunol.* 2011;239:80–86.
- Newell KA, Asare A, Kirk AD, et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest.* 2010;120:1836–1847.

6. Chesneau M, Pallier A, Braza F, et al. Unique B cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients. *Am J Transplant.* 2014;14:144–155.
7. Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, et al. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest.* 2010;120:1848–1861.
8. Cherukuri A, Rothstein DM, Clark B, et al. Immunologic human renal allograft injury associates with an altered IL-10/TNF-alpha expression ratio in regulatory B cells. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25:1575–1585.
9. Cherukuri A, Salama AD, Carter CR, et al. Reduced human transitional B cell T1/T2 ratio is associated with subsequent deterioration in renal allograft function. *Kidney Int.* 2017;91:183–195.
10. Nouel A, Segalen I, Jamin C, et al. B cells display an abnormal distribution and an impaired suppressive function in patients with chronic antibody-mediated rejection. *Kidney Int.* 2014;85:590–599.
11. Latorre I, Esteve-Sole A, Redondo D, et al. Calcineurin and mTOR inhibitors have opposing effects on regulatory T cells while reducing regulatory B cell populations in kidney transplant recipients. *Transpl Immunol.* 2016;35:1–6.
12. Shabir S, Girdlestone J, Briggs D, et al. Transitional B lymphocytes are associated with protection from kidney allograft rejection: a prospective study. *Am J Transplant.* 2015;15:1384–1391.
13. Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, et al. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity.* 2011;34:108–121.
14. He J, Tsai LM, Leong YA, et al. Circulating precursor CCR7(lo)PD-1(hi) CXCR5(+) CD4(+) T cells indicate Tfh cell activity and promote antibody responses upon antigen reexposure. *Immunity.* 2013;39:770–781.
15. Cano-Romero FL, Laguna Goya R, Utrero-Rico A, et al. Longitudinal profile of circulating T follicular helper lymphocytes parallels anti-HLA sensitization in renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 2019;19:89–97.
16. Chenouard A, Chesneau M, Bui Nguyen L, et al. Renal operational tolerance is associated with a defect of blood Tfh cells that exhibit impaired B cell help. *Am J Transplant.* 2017;17:1490–1501.
17. Shi J, Luo F, Shi Q, et al. Increased circulating follicular helper T cells with decreased programmed death-1 in chronic renal allograft rejection. *BMC Nephrol.* 2015;16:182.
18. Laguna-Goya R, Suarez-Fernandez P, Paz-Artal E. Follicular helper T cells and humoral response in organ transplantation. *Transplant Rev (Orlando).* 2019;33:183–190.
19. Linterman MA, Pierson W, Lee SK, et al. Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med.* 2011;17:975–982.
20. Chung Y, Tanaka S, Chu F, et al. Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat Med.* 2011;17:983–988.
21. Wollenberg I, Agua-Doce A, Hernandez A, et al. Regulation of the germinal center reaction by Foxp3+ follicular regulatory T cells. *J Immunol.* 2011;187:4553–4560.
22. Achour A, Simon Q, Mohr A, et al. Human regulatory B cells control the TFH cell response. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140:215–222.
23. Cobo G, Lindholm B, Stenvinkel P. Chronic inflammation in end-stage renal disease and dialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2018;33:iii35–iii40.
24. Ramezani A, Raj DS. The gut microbiome, kidney disease, and targeted interventions. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25:657–670.
25. Kato S, Chmielewski M, Honda H, et al. Aspects of immune dysfunction in end-stage renal disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3:1526–1533.
26. Betjes MG, Langerak AW, van der Spek A, et al. Premature aging of circulating T cells in patients with end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2011;80:208–217.
27. Cippa PE, Liu J, Sun B, et al. A late B lymphocyte action in dysfunctional tissue repair following kidney injury and transplantation. *Nat Commun.* 2019;10:1157.
28. Rebollo-Mesa I, Nova-Lamperti E, Mobillo P, et al. Biomarkers of tolerance in kidney transplantation: are we predicting tolerance or response to immunosuppressive treatment? *Am J Transplant.* 2016;16:3443–3457.
29. Tang Q, Leung J, Melli K, et al. Altered balance between effector T cells and FOXP3+ HELIOS+ regulatory T cells after thymoglobulin induction in kidney transplant recipients. *Transpl Int.* 2012;25:1257–1267.
30. Servais S, Menten-Dedoyart C, Beguin Y, et al. Impact of pre-transplant anti-T cell globulin (ATG) on immune recovery after myeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *PLoS One.* 2015;10:e0130026.
31. Valdez-Ortiz R, Bestard O, Llaudo I, et al. Induction of suppressive allogeneic regulatory T cells via rabbit antithymocyte polyclonal globulin during homeostatic proliferation in rat kidney transplantation. *Transpl Int.* 2015;28:108–119.
32. Clatworthy MR, Watson CJ, Plotnek G, et al. B-cell-depleting induction therapy and acute cellular rejection. *N Engl J Med.* 2009;360:2683–2685.
33. Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, et al. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant.* 2012;12:1157–1167.
34. Fehres CM, van Uden NO, Yeremenko NG, et al. APRIL induces a novel subset of IgA(+) regulatory B cells that suppress inflammation via expression of IL-10 and PD-L1. *Front Immunol.* 2019;10:1368.
35. Khan AR, Hams E, Floudas A, et al. PD-L1hi B cells are critical regulators of humoral immunity. *Nat Commun.* 2015;6:5997.
36. Sage PT, Schildberg FA, Sobel RA, et al. Dendritic cell PD-L1 limits autoimmunity and follicular T cell differentiation and function. *J Immunol.* 2018;200:2592–2602.
37. Haas M, Sis B, Racusen LC, et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant.* 2014;14:272–283.

MATERIAL SUPPLEMENTARIO

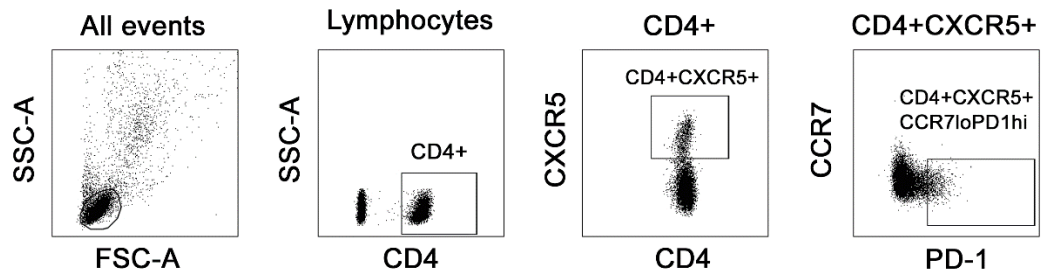


Figure S1. cTfh identification by flow cytometry in KTR. cTfh were identified as CD4⁺CXCR5⁺

PD1^{high}CCR7^{low} cells.

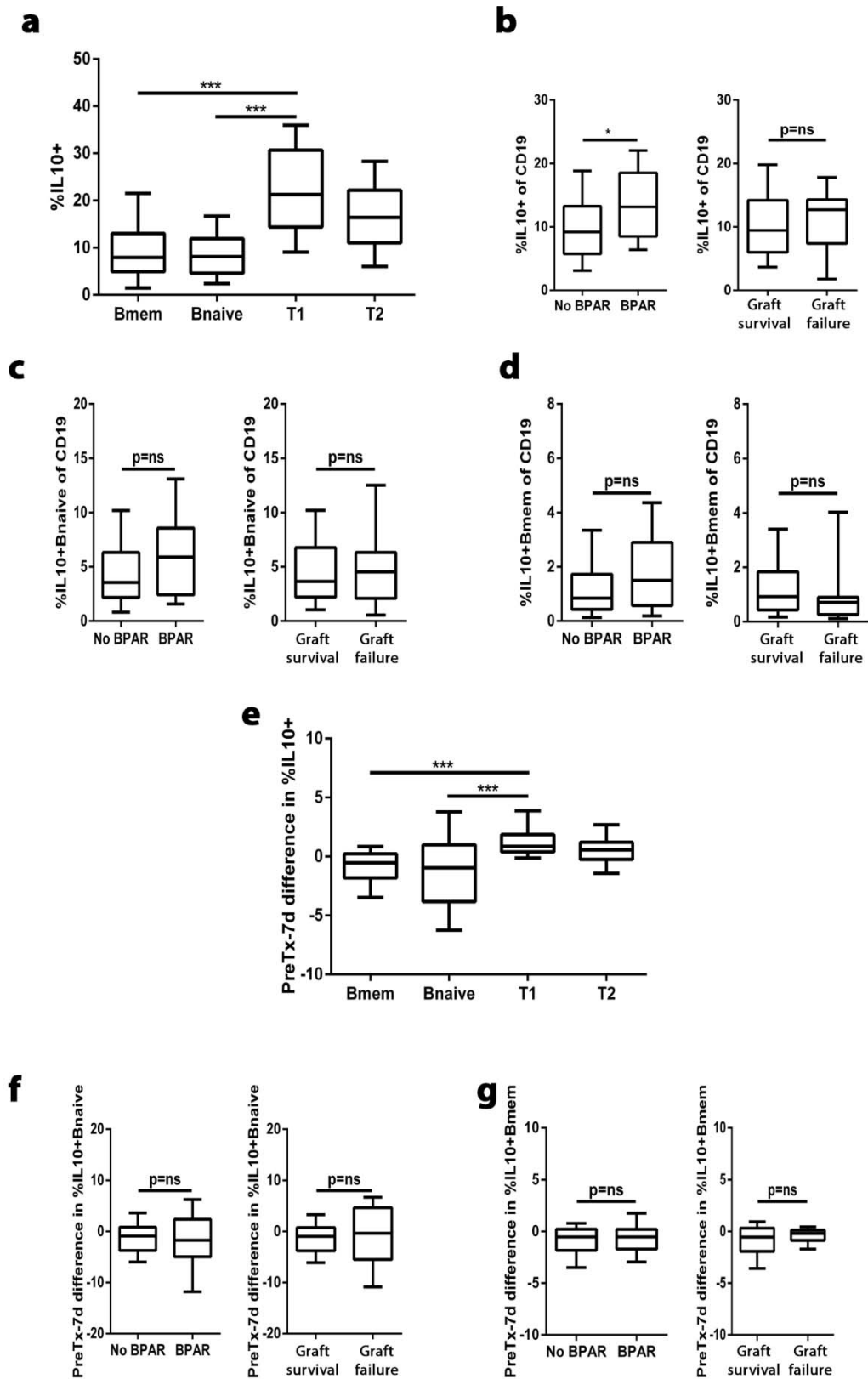


Figure S2. IL10⁺ naïve and IL10⁺ memory B cells had no association with BPAR or graft failure.

(a) Pre-transplant naïve and memory B cells expressed IL10 in lower proportion than T1 cells

(IL10⁺ T1 cells correspond to IL10⁺ Breg cells) ($p < 0.001$). (b) Patients who experienced BPAR had higher pre-transplant frequencies of IL10⁺ B cells than stable patients ($p < 0.05$), while no differences were found between patients with graft survival or failure. (c) No association was found between IL10⁺ naïve B cells and BPAR or graft failure. (d) No association was found either between IL10⁺ memory B cells and BPAR or graft failure. (e) IL10⁺ T1 cells (named IL10⁺ Breg cells) experienced the largest post-transplant reduction of all IL10⁺ B cell subsets ($p < 0.001$). (f-g) Post-transplant changes in IL10⁺ naïve IL10⁺ memory B cells did not correlate with BPAR or graft failure.

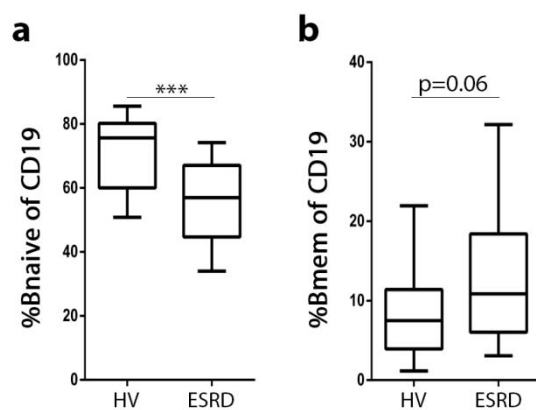


Figure S3. ESRD patients had lower levels of Bnaive and higher levels of Bmem than healthy controls. Comparison of (a) Bnaive and (b) Bmem frequencies between ESRD patients and HV. HV, healthy volunteers; ESRD, end-stage renal disease. (a, b) Mann-Whitney U test. ***, $p < 0.001$.

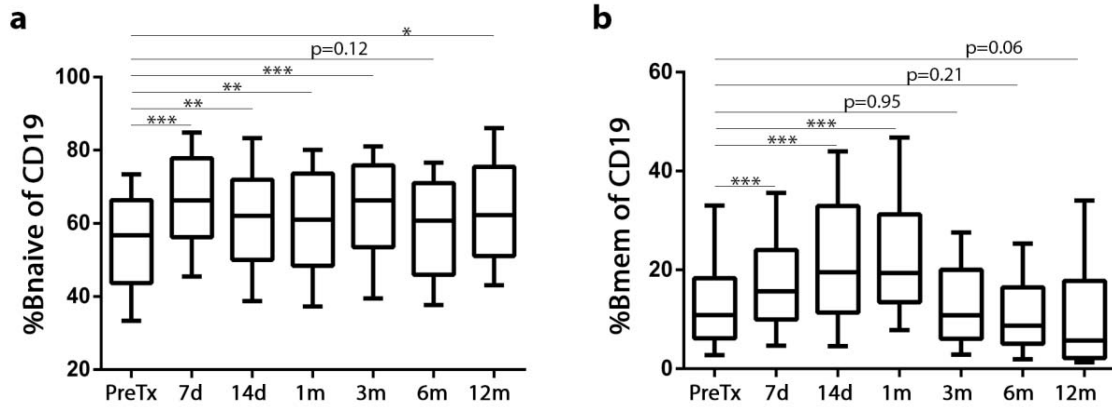


Figure S4. Bnaive were increased during the first year post-transplant while Bmem were elevated during the first month post-transplant only. 1 follow-up year of (a) Bnaive and (b) Bmem. PreTx, pre-transplantation; 7d, day 7 post-transplant; 14d, day 14 post-transplant; 1m, month 1 post-transplant; 3m, month 3 post-transplant; 6m, month 6 post-transplant; 12m, month 12 post-transplant. (a, b) Mann-Whitney U test. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

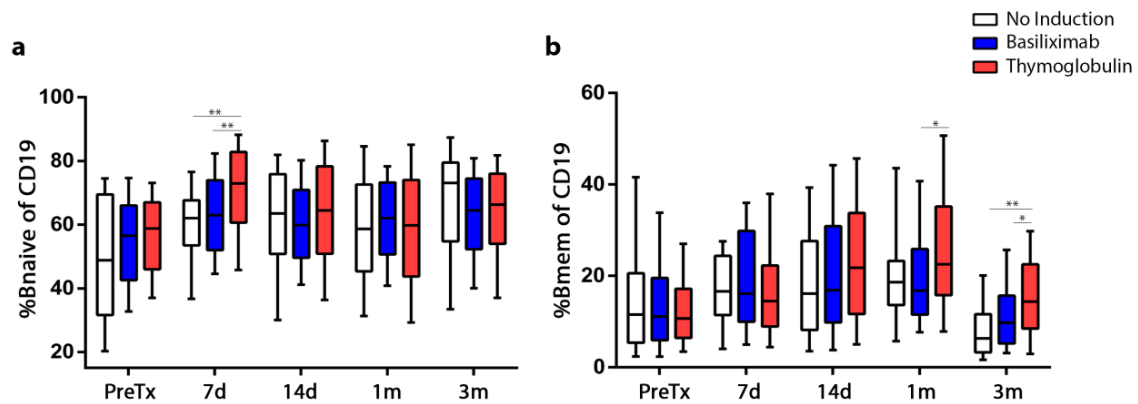


Figure S5. Effect of induction therapy on Bnaive and Bmem. Follow-up of (a) Bnaive and (b) Bmem stratifying kidney recipients according to the induction therapy received. PreTx, pre-transplantation; 7d, day 7 post-transplant; 14d, day 14 post-transplant; 1m, month 1 post-transplant; 3m, month 3 post-transplant. (a, b) Mann-Whitney U test. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

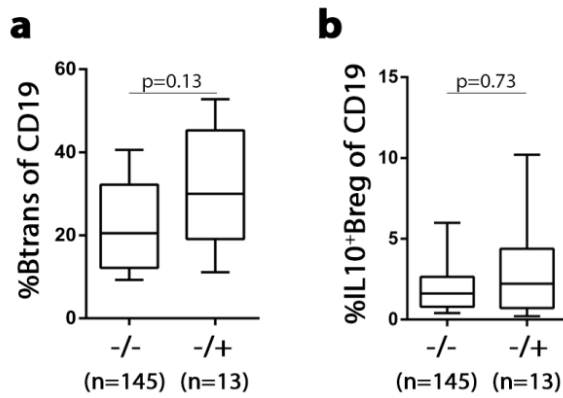


Figure S6. Patients who developed *de novo* anti-HLA antibodies post-transplant had higher levels of transitional and IL10⁺ Breg cells before transplantation. Frequencies of (a) transitional and (b) IL10⁺ Breg cells pre-transplantation were higher in patients who developed *de novo* anti-HLA antibodies post-transplant (-/+) than in those who did not (-/-). (a, b) Mann-Whitney U test.

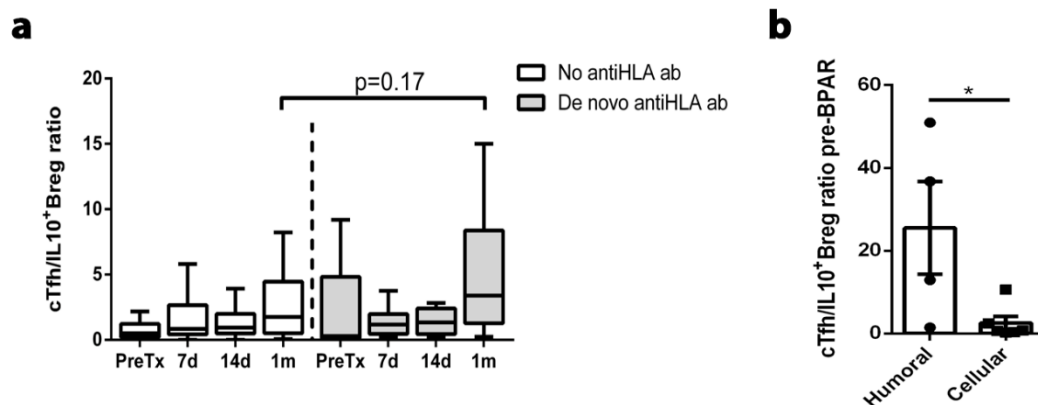


Figure S7. Increased post-transplant cTfh/IL10⁺Breg ratio associated with humoral allograft response. (a) At 1 month post-transplant, there was a trend towards higher cTfh/IL10⁺Breg ratio in patients who were going to develop *de novo* anti-HLA antibodies in the first year post-transplant (grey bars) compared to those who were not going to develop antibodies (white bars) (p=0.17). (b) The cTfh/IL10⁺Breg ratio prior to acute rejection was significantly higher in patients subsequently diagnosed of humoral BPAR compared to patients diagnosed of cellular BPAR (p<0.05).

DISCUSSION

El número de pacientes que desarrolla ERCA ha incrementado con el paso de los años, sin embargo el número de donantes no ha crecido de forma paralela. Pero además, la mitad de los pacientes trasplantados renales va a perder su injerto entorno a los 10 años post-trasplante (196). Esto significa que estos pacientes volverán a ser incluidos en lista de espera para un segundo trasplante renal, disminuyendo sus posibilidades de ser trasplantados de nuevo debido a la sensibilización. Esto hace necesaria la búsqueda de nuevas aproximaciones y biomarcadores de la evolución del injerto renal para poder anticipar el daño renal y poder aplicar terapias preventivas eficaces.

El papel que juega el sistema inmunológico contra el injerto es uno de los principales factores que desencadenan el deterioro y la posterior pérdida del órgano trasplantado. Las terapias inmunosupresoras se han ido optimizando para favorecer la implantación y la supervivencia del injerto. Pero, a pesar de ello, la tolerancia del órgano trasplantado todavía no se ha conseguido y las complicaciones post-trasplante aparecen con frecuencia, conduciendo al deterioro crónico del injerto.

Recientemente, se han identificado poblaciones celulares minoritarias del sistema inmunológico con importantes funciones moduladoras de la respuesta inmunológica, cuyo papel en el trasplante renal no está todavía bien descrito. Dentro del compartimento mieloide, las MDSC se expanden en situaciones inflamatorias crónicas, favorecen un microambiente inmunosupresor y promueven el crecimiento tumoral. Dadas sus funciones, las MDSC podrían tener un papel importante en la tolerancia del injerto e incluso plantearse su uso como terapia celular. Sin embargo, la identificación fenotípica no es suficiente como para determinar que las células analizadas son M-

MDSC, y la evaluación de las capacidades inmunosupresoras *in vitro* se presenta como un requisito fundamental para su identificación.

De forma similar a otros estudios (129-131), aquí se observó que las células CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD15⁻HLA-DR^{low/-} incrementan rápidamente tras el trasplante renal, así como tras el trasplante hepático, lo que sugiere que la inflamación aguda de la cirugía proporciona señales suficientes para inducir la producción y diferenciación de estas células. En línea con estos resultados, se ha observado un aumento de monocitos CD14^{high}CD16⁻ con poca expresión de HLA-DR y funciones inmunosupresoras en las primeras 48 horas tras una pancreatitis aguda (197). Cuando se evaluó la función *in vitro* de células mieloides de pacientes trasplantados, aisladas 14 días tras la cirugía, que se encontraban enriquecidas en células CD14⁺ con baja expresión de HLA-DR, se observó inhibición de la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y reducción de la producción de citoquinas pro-inflamatorias en comparación a las células mieloides de controles sanos, que estaban enriquecidas en células CD14⁺ con alta expresión de HLA-DR. Dadas estas observaciones y atendiendo a las recomendaciones de la bibliografía, se pudo concluir que estas células representan realmente a las M-MDSC en pacientes trasplantados. De forma similar, en un estudio prospectivo en pacientes receptores de un trasplante renal, observaron que las células mieloides con baja expresión de HLA-DR se mantenían aumentadas durante todo el primer año post-trasplante y que estas células inhibían la proliferación de los linfocitos T *in vitro*. En ese estudio, encontraron que las funciones inmunosupresoras de las células mieloides identificadas en el post-trasplante eran atribuibles principalmente a células CD14⁺HLA-DR^{low} o M-MDSC (129). Además estas M-MDSC eran capaces de mediar la diferenciación de linfocitos T a Treg.

Las M-MDSC aumentaron post-trasplante en los receptores independientemente de que no hubieran recibido terapia de inducción o que se hubieran tratado con timoglobulina ó con basiliximab, lo que sugiere dos hipótesis: (a) que las M-MDSC no expresan las dianas de estos fármacos; (b) o alternativamente, que si éstos fármacos les afectan, las señales de inflamación favorecen su desarrollo por encima de su depleción. En contraposición a nuestras observaciones, se ha descrito que la timoglobulina se une a las M-MDSC y reduce su número y su función inmunosupresora en ratones con carcinoma pulmonar de Lewis (198). Estos resultados contradictorios podrían explicarse por: (a) la diferencia entre las especies estudiadas, ratones y humanos, donde las M-MDSC son diferentes; o bien por (b) el distinto modelo experimental, cáncer y trasplante.

Al igual que en otros trabajos (128-130), en este estudio las M-MDSC permanecieron elevadas con respecto al pre-trasplante durante el primer año post-trasplante, lo que sugiere que estas células también son resistentes a la terapia de mantenimiento con tacrólimus, o bien que el estímulo inflamatorio mantiene la diferenciación de estas células por encima del efecto de la terapia inmunosupresora. El efecto de los inhibidores de la calcineurina en las MDSC es todavía controvertido, ya que algunos estudios han mostrado que la ciclosporina disminuye los números de MDSC de forma dosis-dependiente (199), mientras que otros concluyen que la ciclosporina aumenta tanto los números como la función de las MDSC (200). El efecto del tacrólimus sobre las MDSC no ha sido evaluado hasta el momento.

Dado el carácter inmunosupresor de las MDSC, este estudio se emprendió básicamente partiendo de la hipótesis de que una mayor cantidad de MDSC se asociaría de forma

directa con menor aparición de eventos de rechazo agudo y mayor prolongación en el tiempo de desarrollo de rechazo crónico y supervivencia del injerto. Sin embargo, en el análisis exploratorio inicial de la relación entre los niveles de M-MDSC y los eventos posteriores al trasplante renal no se encontraron esas asociaciones, observándose que la asociación estadísticamente más potente correspondía a la que relacionaba el aumento de M-MDSC con el desarrollo de cánceres *de novo* post-trasplante. Esta observación es muy interesante ya que sugiere que la acumulación de M-MDSC no es solo coincidente con el desarrollo del tumor, como se ha descrito repetidamente, sino que podría precederlo. Cuando aparece un tumor, las MDSC se consideran una pieza fundamental para la formación de nichos pre-metastásicos a los que se dirigen y donde anidan las células tumorales (120). En un modelo de adenocarcinoma mamario murino se observó que las MDSC se acumulan en los pulmones antes de la llegada de las células tumorales (201). Varios mecanismos de las MDSC participan en el acondicionamiento del microambiente para la colonización tumoral, lo que incluye modificaciones locales y efectos sistémicos en el sistema inmune. Con estos antecedentes, es plausible especular que niveles elevados de M-MDSC en sangre periférica y su migración a tejido podrían promover un microambiente inmunosupresor que favorecería, no sólo el desarrollo de metástasis, sino también el crecimiento del tumor primario. De acuerdo con esta hipótesis, nosotros observamos que los pacientes que desarrollaron cáncer de novo mostraron en todo momento, durante todo el primer mes post-trasplante, niveles significativamente superiores de M-MDSC en comparación a los pacientes trasplantados que no lo desarrollaron. Pero además, 3 meses post-trasplante, los pacientes que posteriormente desarrollaron cáncer aún seguían manteniendo niveles elevados de M-

MDSC en comparación al resto de pacientes (129,2 células/uL vs 53,4 células/uL, respectivamente, $p=0,087$).

Las drogas inmunosupresoras son un factor de riesgo favorecedor del desarrollo de cáncer *de novo* tras el trasplante (202). La incidencia de aparición de tumores se relaciona con tratamientos prolongados, altas dosis de inhibidores de la calcineurina (203-205) o el uso de agentes deplecionantes de linfocitos T (59, 206, 207). Esta incidencia superior puede explicarse por la alteración de la inmunovigilancia debida a la inmunosupresión crónica, que promovería el crecimiento tumoral a través de mecanismos que incluirían por ejemplo la reducción de linfocitos T CD8⁺ (208), la disminución de la actividad de las células NK (209), el aumento de la senescencia de los linfocitos T (210) y el aumento de los niveles de Treg (211, 212). Dados los resultados de nuestro estudio, cabría concluir que la rápida movilización y acumulación de M-MDSC tras la cirugía, junto a su resistencia a las terapias inmunosupresoras de inducción y de mantenimiento, se sumaría a estos mecanismos favorecedores del desarrollo de cáncer en los pacientes trasplantados renales.

En concordancia con el papel inmunosupresor de las M-MDSC, en la cohorte analizada se encontró que estas células mostraron una tendencia a estar disminuidas en situaciones de activación inmunológica, como el rechazo agudo o la sensibilización a HLA. Otros estudios han reportado resultados similares. Se encontraron números reducidos de MDSC en pacientes receptores de un trasplante intestinal con diagnóstico de rechazo celular (213). En otro estudio en trasplante renal se observó además que tras el episodio de rechazo agudo, la supervivencia del injerto fue significativamente superior en aquellos receptores con niveles elevados de MDSC (130). En línea con estas

dos observaciones, se ha reportado también que en pacientes con trasplantes renales de más de 10 años, función estable de los injertos y bajas dosis de inmunosupresores, los niveles de M-MDSC fueron significativamente superiores en comparación a receptores con tiempos de trasplante inferiores, además tiempos prolongados de supervivencia del injerto se asociaron de forma directa con niveles elevados de M-MDSC (132). Más recientemente, se ha observado que, en ratones de edades avanzadas con altos niveles de MDSC en comparación a ratones más jóvenes, la supervivencia del aloinjerto de piel es significativamente superior; pero si se bloquea la función de las MDSC en ratones añosos, la supervivencia del injerto es similar a la de ratones jóvenes (214). En un modelo animal de trasplante de médula ósea observaron que las MDSC promovían la tolerancia inhibiendo la enfermedad de injerto contra huésped. Esta tolerancia fue muy dependiente deIDO, ya que ratones *knockout* paraIDO, se observó ambiente más inflamatorio y menores niveles de Treg, lo que se tradujo en enfermedad de injerto contra huésped muy severa (215). En un modelo de trasplante de corazón en ratones, los autores observaron que la ruta mTOR es crucial para el desarrollo de células mieloides pro-inflamatorias, mientras que su deficiencia promueve el desarrollo de M-MDSC, pero además potencia su función inmunosupresora. La terapia celular con M-MDSC de ratones *knockout* para mTOR prolongó de forma significativa la supervivencia del injerto más que la terapia con M-MDSC de ratones *wild type* (216). En un modelo similar de trasplante de corazón, los investigadores llegaron a la conclusión de que son las M-MDSC derivadas de médula ósea *in vitro*, y no las PMN-MDSC, las encargadas de generar el ambiente inmunosupresor que promueve la tolerancia del injerto. Para ello, el mecanismo más importante para la generación de este ambiente es la síntesis de iNOS y la inducción de Treg (217). En los trasplantes de córnea entre ratones, la infusión de

MDSC derivadas de médula ósea también prolongó la supervivencia del injerto (218). Todos estos hallazgos muestran un papel beneficioso de las MDSC en la limitación de la respuesta aloinmune, a favor de la tolerancia del injerto; y su potencial uso como terapia celular dirigida a la tolerancia del injerto.

Por otro lado, y en consonancia con nuestras observaciones, en 331 pacientes con hepatocarcinoma tratado con trasplante hepático, observaron que había mayor recurrencia del tumor en aquellos pacientes que mantenían niveles elevados de MDSC en el post-trasplante. Este resultado fue validado en un modelo de trasplante ortotópico en ratas. También observaron que las M-MDSC, y no las PMN-MDSC, son las encargadas de generar el ambiente anti-inflamatorio y pro-tolerogénico para la aceptación del injerto. Pero además, concluyeron que la quimioquina CXCL10 es necesaria para la acumulación y la función inmunosupresora de las M-MDSC (219). En conjunto, todos estos resultados sugieren que el aumento de MDSC post-trasplante, así como la infusión de M-MDSC en el receptor, promueven la tolerancia del injerto; pero la elevación excesiva de M-MDSC y el mantenimiento a lo largo de todo el post-trasplante de esos niveles elevados podrían inducir el desarrollo o recurrencia de tumores. Por lo tanto, nuevos estudios que determinen los niveles en los que las M-MDSC son beneficiosas para la tolerancia del injerto y aquellos niveles en los que las M-MDSC son perjudiciales ya que promueven el desarrollo de tumores, podrían generar una nueva herramienta que nos permitiría monitorizar y predecir acontecimientos en los pacientes trasplantados.

El efecto pro-tolerogénico de las MDSC post-trasplante se ha relacionado parcialmente con su capacidad para inducir Treg (129, 130). Aunque mayores niveles de Treg podrían

ser beneficiosos y proteger al injerto del rechazo, niveles elevados de Treg se han observado en pacientes trasplantados renales con tumores sólidos del injerto o con carcinoma cutáneo de células escamosas (212); y niveles elevados de Treg en sangre periférica e infiltrantes en el injerto predijeron la aparición de carcinoma de células escamosas en pacientes trasplantados renales (211). La inducción de Treg a partir de linfocitos T *naïve* es uno de los mecanismos más importantes a partir de los cuáles las M-MDSC inducen el ambiente inmunosupresor, sin embargo nuestro estudio presenta la limitación de no haberse analizado la presencia de Treg en los cultivos de proliferación.

En nuestra cohorte de pacientes trasplantados se observó una expresión disminuida de CD11b en las células mieloides de pacientes que posteriormente desarrollaron cáncer *de novo* en comparación a aquellos que no lo hicieron. Este hallazgo es congruente con la observación de que la pérdida de la expresión o función de CD11b promueve la expresión de genes supresores en macrófagos asociados a tumores, aumenta las Treg y disminuye el reclutamiento de linfocitos T CD8 al tumor (220). Otras moléculas relacionadas con la función inmunosupresora de las M-MDSC son la arginasa 1, la IL10 y la MMP-9, por lo que especulamos que podrían acumularse en consonancia al aumento de M-MDSC y podrían estar promoviendo un ambiente inmunosupresor en pacientes trasplantados renales. En nuestro estudio observamos que los niveles de arginasa 1 e IL10 mostraban una tendencia a estar más elevados en pacientes que desarrollaron cáncer *de novo* en comparación a aquellos trasplantados que no. Probablemente debido a que el número de pacientes que desarrolló cáncer fue reducido, el aumento de arginasa 1 e IL10 en ellos no alcanzó la significación estadística. Se ha observado que tanto la promoción del crecimiento tumoral como la inhibición de funciones

inmunológicas está muy relacionado con la arginasa 1, la IL10 y la MMP9 derivadas de las M-MDSC (95, 221-224), aunque podrían contribuir de forma distinta en diferentes situaciones clínicas y modelos tumorales (100, 225). En el trasplante, se ha observado una supervivencia prolongada del injerto de piel en aquellos ratones en los que las MDSC sintetizaban grandes cantidades de arginasa-1 (226) o en ratones que recibieron terapia celular con MDSC generadas con LPS *in vitro*, capaces de sintetizar grandes cantidades de IL10 (227). En biopsias renales humanas de injertos con rechazo agudo que subsecuentemente consiguieron la supervivencia del injerto, se observó una correlación entre altos niveles de expresión de las proteínas S100A9, la infiltración de MDSC y un incremento de IL10 (106). Los resultados en estos modelos apoyan el papel de la arginasa-1 y de la IL10 derivadas de M-MDSC como mediadores de la inhibición de la respuesta inmune en el trasplante. En línea con estas observaciones, nosotros encontramos una correlación directa y significativa entre los niveles circulantes de M-MDSC e IL10 y arginasa 1, lo que apoyaría la idea de que el aumento de estas moléculas inmunosupresoras en sangre podría ser derivar de la acumulación de M-MDSC en pacientes trasplantados.

Otro de los mecanismos inmunosupresores asociados con las M-MDSC se atribuye a su capacidad de sintetizar grandes cantidades de moléculas que participan en el estrés oxidativo como las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. Debido a que los pacientes receptores de un trasplante renal tienen mayores niveles de M-MDSC circulantes, se podría anticipar que también podrían tener mayores concentraciones plasmáticas de estas moléculas asociadas al estrés oxidativo. La evaluación directa de las especies reactivas de oxígeno es difícil debido a su tiempo de vida corto. Por esta razón, en el presente estudio se analizó la actividad antioxidante total disponible en el

organismo como un indicador de la capacidad para neutralizar especies reactivas de oxígeno. Aunque no encontramos menores niveles de actividad antioxidante total en pacientes trasplantados que posteriormente desarrollaron cánceres *de novo*, se encontró una correlación negativa entre los niveles de M-MDSC y la actividad antioxidante total, lo que sugiere que la capacidad antioxidante global no es capaz de contrarrestar el aumento de M-MDSC, lo que resulta en un ambiente oxidativo, inmunosupresor y pro-tumoral. En línea con esta explicación, un aumento de especies reactivas de oxígeno con una disminución de la capacidad antioxidante total se ha observado en pacientes con cáncer oral, carcinoma de células escamosas o cáncer de colon (228, 229).

En conjunto todos estos resultados sugieren que el aumento de M-MDSC y los factores solubles derivados preceden, y pueden contribuir, al desarrollo de cáncer *de novo* en los pacientes trasplantados renales. Por lo tanto, la monitorización del compartimento mielóide circulatorio podría ser útil para anticipar el desarrollo de cáncer después del trasplante. Si estos resultados se confirman de forma multicéntrica, el análisis de las M-MDSC podría considerarse en el diseño de perfiles de inmuno-monitorización para predecir el riesgo de tumores *de novo* en pacientes trasplantados renales.

Además del compartimento mielóide, en el compartimento adaptativo del sistema inmunológico se han descrito recientemente poblaciones celulares minoritarias que poseen importantes funciones inmuno-moduladoras. Todavía no se conoce ni su papel en el trasplante renal ni el efecto de los fármacos inmunosupresoras sobre ellas. Entre estas poblaciones se encuentran las denominadas Breg.

Las células Breg son una población minoritaria que contribuye al mantenimiento de la tolerancia inmune a través de la producción de IL10, entre otros mecanismos. Este ha sido el primer estudio prospectivo en pacientes trasplantados renales que, a diferencia de estudios anteriores, no solo analiza la población de células B transicionales (CD19⁺CD24⁺CD38⁺) asumiendo que esta población contiene una gran mayoría de células B con función reguladora, sino que enumera en concreto las células B reguladoras capaces de producir IL10 *in vitro*, pre- y post-trasplante. Cherukuri et al (230) describieron una *ratio* entre células que ellos denominaron T1 y T2, incluidas dentro de las células B transicionales. Mientras que las células T1 se identificaron con un fenotipo CD24^{high}CD38^{high} y con funciones inmunosupresoras más potentes ya que presentaban mayor capacidad para producir IL10, las T2 se identificaron como células CD24⁺CD38⁺ y productoras de menores niveles de IL10. En ese mismo estudio observaron que ratios T1/T2 elevados a los 2 años post-trasplante se asociaron con el posterior deterioro de la función del injerto, y se propuso esta ratio como un biomarcador pronóstico en trasplante que no requería el marcaje intracitoplasmático de IL10. Sin embargo, nosotros no pudimos replicar estos resultados utilizando el ratio T1/T2 en momentos más tempranos en el post-trasplante. En nuestro estudio corroboramos que existe un mayor porcentaje de células T1 con capacidad para producir IL10 en comparación a las células T2, y además observamos una tendencia a desarrollar anticuerpos anti-HLA y rechazo agudo del injerto en aquellos pacientes trasplantados con menores niveles de células T1. Sin embargo, cuando analizamos exclusivamente aquellas células capaces de producir IL10 dentro de las células T1, denominadas IL10⁺Breg, encontramos significaciones más potentes con eventos en el post-trasplante. Por lo tanto, el análisis de las células IL10⁺Breg, que son las que tienen

el potencial de producir IL10 *in vivo*, puede proporcionar información muy útil para la monitorización del paciente.

En pacientes con ERCA, antes del trasplante, las células IL10⁺Breg y las células B transicionales se encontraron aumentadas en comparación con los controles sanos. Aunque no se pudo conocer el motivo de este aumento, ya que no se encontró asociación con la edad, la diálisis, la sensibilización HLA previa y otras variables clínicas; la ERCA es un estado pro-inflamatorio (231, 232) y las células Breg podrían estar aumentadas en estos pacientes con la finalidad de compensar dicho ambiente inflamatorio. La proporción de células B memoria también se encontró aumentada en pacientes con ERCA, mientras que la proporción de células B *naïve* estaba significativamente disminuida. Esta distribución anormal podría estar relacionada con la situación de uremia, ya que se ha publicado que este estado metabólico puede alterar los compartimentos celulares del sistema inmunológico de diferentes maneras (233, 234).

Después del trasplante, las células IL10⁺Breg y las células B transicionales disminuyeron significativamente, de forma similar a lo que mostraron Shabir et al (195); mientras que las células B memoria y *naïve* aumentaron. Estos cambios en la composición relativa del compartimento de células B podrían tener consecuencias en la respuesta inmune contra el aloinjerto. En este sentido, se han encontrado firmas transcriptómicas específicas de células B asociadas tanto con tolerancia del injerto (235) como con daño renal crónico (236). En nuestra cohorte, todos los trasplantados renales recibieron la misma terapia de inmunosupresión de mantenimiento, que incluye tacrólimus, micofenolato mofetil y glucocorticoides, lo que no permitió discernir el efecto específico de cada uno de estos

fármacos sobre las células B. Sin embargo, la disminución de células B transicionales e IL10⁺Breg post-trasplante es consistente con un estudio previo, en el que demuestran que la prednisona reduce los niveles de células B transicionales de forma dosis-dependiente (237). De forma similar, en el estudio de Latorre et al (238), los autores describen una reducción significativa de células B transicionales e IL10⁺Breg en pacientes trasplantados tratados con inhibidores de la calcineurina o de mTOR comparado con controles sanos. Con respecto a las terapias de inducción, la timoglobulina redujo claramente los niveles de células B transicionales e IL10⁺Breg en nuestra cohorte. Este efecto es distinto al observado sobre las células Treg, ya que estas células se preservan en pacientes tratados con timoglobulina (239, 240) e incluso se expanden en modelos animales de trasplante tratados con el mismo inmunosupresor (241). Es también muy relevante el efecto de las terapias inmunosupresoras dirigidas a la depleción de las células B, como el rituximab, ya que su uso en trasplante y autoinmunidad está aumentando considerablemente. Rituximab elimina todas las subpoblaciones de células B, incluyendo las células B transicionales y las IL10⁺Breg, y este efecto debería tenerse en cuenta al diseñar protocolos de desensibilización o tratamientos del rechazo agudo mediado por anticuerpos, ya que de forma indirecta se podría favorecer el rechazo agudo celular (242). En nuestra cohorte, 2 pacientes que fueron trasplantados con anticuerpos donante-específicos recibieron inducción con rituximab, lo que pudo reducir todavía más el número de IL10⁺Breg desde el pre- al post-trasplante. Sin embargo, no se observó que rituximab influyera en la asociación entre la caída post-trasplante de IL10⁺Breg y el rechazo agudo demostrado por biopsia (BPAR) ya que los pacientes tratados con ese fármaco pertenecieron al grupo de función estable del injerto y no al de BPAR.

En este estudio se buscaron asociaciones entre los números de IL10⁺Breg en el pre-trasplante y el desarrollo de rechazo agudo y la función global del injerto post-trasplante. En primer lugar, se observó que los pacientes que desarrollan BPAR o pérdida de la función del injerto tenían niveles significativamente superiores de IL10⁺Breg y de B transicionales en el pre-trasplante en comparación a pacientes trasplantados con función estable del injerto. Estos hallazgos junto a los valores de áreas bajo la curva (0,72 y 0,73) sugieren el nivel de IL10⁺Breg pre-trasplante podría ser un buen biomarcador predictor del rechazo agudo y del fallo del injerto. De hecho, aquellos pacientes con niveles de IL10⁺Breg en el pre-trasplante superiores a la mediana (1,62%) mostraron significativamente menor supervivencia libre de rechazo y de fallo del injerto en comparación a aquellos con niveles por debajo de la mediana. Sin embargo, es conocido que otros factores como la edad o la aparición de anticuerpos anti-HLA en el post-trasplante son factores estrechamente relacionados con el rechazo y el fallo del injerto. Por este motivo evaluamos la asociación de las IL10⁺Breg con eventos post-trasplante de forma multivariante. Los resultados mostraron que niveles de IL10⁺Breg superiores a la mediana surgen como un factor de riesgo independiente para el rechazo agudo y para fallo del injerto renal. Utilizando el punto de corte óptimo calculado a partir del análisis de curvas ROC se obtuvieron resultados similares, sin embargo, nosotros proponemos la mediana de la frecuencia de IL10⁺Breg como un parámetro que puede ser fácilmente trasladado a otros laboratorios clínicos, más que un cut-off en particular. De forma contraria a nuestro estudio, Shabir et al (195) observaron que los pacientes que no rechazaban mostraron niveles superiores de células B transicionales en el pre- y en el pos-trasplante en comparación a los que si rechazaban; sin embargo, su cohorte de pacientes es más diversa desde el punto de vista étnico, y en su estudio las células B

transicionales se analizaron de forma diferente y a partir de células mononucleares de sangre periférica previamente congeladas. De todas formas, ambos estudios, el de Shabir et al (195) y el nuestro concuerdan en que la disminución de células Breg después del trasplante favorece la alorespuesta. Nuestro estudio además encuentra la bien establecida correlación entre anticuerpos HLA donante-específicos *de novo* y los eventos adversos post-trasplante (160, 243), lo que valida las nuevas asociaciones observadas.

La relación encontrada entre la expansión de células IL10⁺Breg en el pre-trasplante y mayor alorreactividad podría parecer contraria al concepto de que células inmunosupresoras se asocian con tolerancia. Sin embargo, la expansión de células Breg en el pre-trasplante podría indicar un aumento de la necesidad de regulación inmunológica en pacientes específicos. La alteración del balance inmunológico regulador-efector post-trasplante, como consecuencia de la inmunosupresión, podría favorecer el aloreconocimiento del injerto. En línea con esta idea se analizó la dinámica de las células B también en el post-trasplante y su asociación con el rechazo agudo y el fallo del injerto. Los resultados mostraron que la reducción tanto de IL10⁺Breg como de B transicionales era superior desde el pre-trasplante a los 7 días post-trasplante en aquellos pacientes que posteriormente desarrollaron BPAR o fallo del injerto. La supervivencia libre de BPAR o de fallo del injerto fue significativamente menor en aquellos pacientes que mostraron reducciones de IL10⁺Breg superiores a la mediana (0,85%). El análisis multivariante incluyendo la función retrasada del injerto (necesidad de diálisis en las dos primeras semanas post-trasplante) y la aparición de anticuerpos anti-HLA *de novo* mostró que la reducción de células IL10⁺Breg desde el pre-trasplante

a los 7 días post-trasplante también surge como un factor de riesgo independiente para el rechazo agudo y el fallo del injerto renal.

El interés por entender el significado de las células B reguladoras y la posibilidad de encontrar biomarcadores basados en su análisis en los pacientes trasplantados va en aumento. Recientemente, se ha observado que en receptores de trasplante hepático, los niveles de células Breg fueron significativamente inferiores en pacientes que experimentaron rechazo agudo del injerto que en pacientes con función estable (244). En trasplantados de riñón, altos niveles de células Breg que expresan CD25 en su membrana se asociaron con una mejor función del injerto tras el trasplante (245). En otro estudio donde se analizaron de forma prospectiva las células Breg y Treg en pacientes receptores de un trasplante renal, observaron que las células Breg estaban disminuidas en pacientes con enfermedad renal crónica pero que eran todavía inferiores tras el trasplante. Los niveles altos de Breg post-trasplante se asociaron con mejor función del aloinjerto. En experimentos *in vitro* se observó que los fármacos inmunosupresores de mantenimiento no tenían ningún efecto sobre las células Breg, mientras que si afectaban significativamente a las Treg y a otras poblaciones de células T. En nuestro estudio, la reducción de Breg no se asoció a ningún tratamiento específico y por lo tanto concluimos que la reducción de Breg tras el trasplante no se debía a un efecto directo de los inmunosupresores, y se atribuyó a la ausencia de señales de mantenimiento de las Breg que en condiciones normales deberían proporcionar las células T, que se encontrarían disminuidas o abolidas por la terapia inmunosupresora (246). Es preciso realizar más estudios para concluir definitivamente si las poblaciones B reguladoras son beneficiosas para la función del injerto renal y para dilucidar el efecto de los inmunosupresores utilizados en la actualidad sobre ellas. Si se demuestra que

estos fármacos son deletéreos para el mantenimiento y función de las poblaciones celulares reguladoras, debería pensarse en el diseño de nuevas moléculas terapéuticas con capacidad de respetarlas.

En contraposición a las células Breg, los linfocitos cTfh se han asociado con la sensibilización HLA y el rechazo del injerto. En línea con esta idea, se han encontrado niveles elevados de cTfh en pacientes trasplantados renales que estaban desarrollando rechazo crónico del injerto (147) y en biopsias de pacientes trasplantados renales que experimentaban rechazo agudo (148). Además, en pacientes con tolerancia operacional los niveles de cTfh eran similares a los de controles sanos pero eran incapaces de inducir la producción de inmunoglobulina por los linfocitos B (149). En estudios *in vitro* se ha observado que las células Breg inhiben la maduración de las Tfh y su capacidad de favorecer la secreción de anticuerpos por los plasmablastos (247). En base a estas observaciones, quisimos analizar en nuestra cohorte de pacientes trasplantados si existía una posible relación entre Breg y cTfh y cómo influiría esta relación en la evolución del trasplante. En esta cohorte, se había encontrado previamente que niveles elevados de cTfh en el pre-trasplante se asociaban de forma significativa con el rechazo agudo (150). En el presente estudio, encontramos una correlación directa entre los niveles de células IL10⁺Breg y cTfh en pacientes con ERCA en el pre-trasplante (247). Al analizar la dinámica de la ratio cTfh/IL10⁺Breg en el post-trasplante se observó un incremento constante a favor del aumento progresivo de cTfh mientras que las IL10⁺Breg se mantienen disminuidas durante todo el post-trasplante. Un incremento significativamente mayor de la ratio cTfh/IL10⁺Breg en el post-trasplante se asoció con rechazo agudo del injerto, lo que sugiere que una desregulación a favor de los niveles de cTfh y con menos células IL10⁺Breg podría promover la actividad de las cTfh y el

rechazo. Los mecanismos por los que las células IL10⁺Breg regulan la actividad de las cTfh incluyen: (a) la expansión de células T cooperadoras foliculares reguladoras; (b) la producción de IL10 y de TGFβ solubles, que son capaces de modular a la baja la síntesis de IL21 y la expresión de CXCR5 en las Tfh (247); y (c) la expresión aumentada de PD-L1 en membrana (160, 248, 249). Nuestros hallazgos no obstante provienen de la observación de estas dos poblaciones celulares en sangre periférica, sería necesario ampliar los estudios a poblaciones de nódulos linfoides y del injerto para comprender mejor su interacción. Finalmente, todos los resultados mostrados provienen de un estudio unicéntrico, por lo que la validación de estos resultados de forma multicéntrica es imprescindible.

En resumen, el análisis pre-trasplante de las células IL10⁺Breg podría proponerse como un biomarcador de utilidad para identificar los receptores que están en alto riesgo de rechazo agudo y de pérdida del injerto permitiendo de esta manera utilizar terapias personalizadas para disminuir el riesgo. Después del trasplante las células IL10⁺Breg disminuyen y el ratio cTfh/IL10⁺Breg aumenta. Ambos cambios son más pronunciados en los pacientes que posteriormente desarrollan rechazo o pérdida del injerto, sugiriendo que modificaciones en este balance inmunológico post-trasplante tiene un efecto perjudicial sobre el injerto. Estos resultados sugieren que sería conveniente el desarrollo de nuevas terapias inmunosupresoras que promuevan la persistencia de células IL10⁺Breg mientras que deplecionan las cTfh.

Recientemente, se ha descrito que las MDSC, más concretamente las M-MDSC, también tienen la capacidad de modular las respuestas de los linfocitos B. Las M-MDSC inhiben la función de los linfocitos B mediante con contacto directo y mediante la liberación de

IDO, arginasa-1 y óxido nítrico; además provocan la disminución de la expresión de IgM, HLA-DR, CD80, CD86, TACI y CD95 en la superficie de los linfocitos B (250, 251). A su vez también se ha mostrado que las células IL10⁺Breg tienen la capacidad de inhibir la función de los macrófagos derivados de células mieloides (252). Pero además, podría existir una relación directa entre MDSC e IL10⁺Breg, ya que se ha demostrado que las MDSC tienen la capacidad de expandir células IL10⁺Breg *in vitro* e *in vivo*, mientras disminuye los niveles de cTfh, Th1 y Th17 en modelos animales (253). Estos antecedentes sugieren que en nuestro estudio podría existir una relación entre ambas poblaciones celulares. Sin embargo, cuando analizamos la correlación entre ambas, no encontramos ninguna asociación significativa ni en el pre- ni en el post-trasplante. Las células IL10⁺Breg siguen una dinámica opuesta a las M-MDSC, mientras que las primeras disminuyen, las segundas aumentan en el post-trasplante inmediato. El efecto de las drogas inmunosupresoras sobre las células IL10⁺Breg podría estar enmascarando posibles relaciones entre ambos tipos celulares. Modelos libres de los efectos de los fármacos inmunosupresores podrían ser de más utilidad y arrojar luz en las posibles interacciones entre MDSC e IL10⁺Breg.

CONCLUSIONES

Según los objetivos generales planteados en este trabajo, las conclusiones son:

1. Una población celular de sangre periférica, caracterizada por la expresión de CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD15⁻HLA-DR^{low/-} se expande inmediatamente tras el trasplante renal y muestra potentes funciones inmunosupresoras sobre los linfocitos T. Estos datos apoyan sólidamente la identidad de estas células como M-MDSC.
2. Las M-MDSC se mantienen aumentadas durante el primer año post-trasplante con respecto al pre-trasplante, sin que se observe efecto deletéreo alguno de los fármacos inmunosupresores de mantenimiento, y se asocian con mayores niveles circulantes de IL10 y MMP9 y menor capacidad antioxidante total.
3. Los pacientes con mayores niveles de M-MDSC mantenidos durante el primer mes post-trasplante tienen mayor riesgo de desarrollar tumores sólidos durante los dos primeros años post-trasplante.
4. Las células IL10⁺Breg están aumentadas en pacientes con ERCA en comparación a controles sanos, antes del trasplante, mientras que en el post-trasplante se observa una disminución muy significativa que podría atribuirse a la terapia inmunosupresora.
5. Los pacientes con los niveles más altos de IL10⁺Breg en el pre-trasplante tienen mayor riesgo de desarrollar rechazo agudo del injerto. En el post-trasplante hay una disminución muy significativa de las IL10⁺Breg.
6. Los pacientes con los niveles más altos de IL10⁺Breg en el pre-trasplante, pero que experimentan reducciones más importantes en el número de estas células tras el trasplante, tienen mayor riesgo de desarrollar rechazo agudo del injerto.

7. Existe una relación directa entre los niveles de cTfh e IL10⁺Breg en el pre-trasplante cuyo equilibrio se va perdiendo en el post-trasplante a favor de las cTfh. Los rechazos agudos están precedidos por valores más altos de la ratio cTfh/IL10⁺Breg.

BIBLIOGRAFIA

1. A. C. Webster, E. V. Nagler, R. L. Morton, P. Masson, Chronic Kidney Disease. *Lancet* **389**, 1238-1252 (2017).
2. M. Gorostidi *et al.*, Chronic kidney disease in Spain: Prevalence and impact of accumulation of cardiovascular risk factors. *Nefrologia (Engl Ed)* **38**, 606-615 (2018).
3. <http://www.ont.es/infesp/Registros/MEMORIA%20REER%202019.pdf>.
4. A. K. Bello *et al.*, Status of care for end stage kidney disease in countries and regions worldwide: international cross sectional survey. *BMJ* **367**, l5873 (2019).
5. E. J. Lamb, P. E. Stevens, Estimating and measuring glomerular filtration rate: methods of measurement and markers for estimation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **23**, 258-266 (2014).
6. A. S. Levey, C. Becker, L. A. Inker, Glomerular filtration rate and albuminuria for detection and staging of acute and chronic kidney disease in adults: a systematic review. *JAMA* **313**, 837-846 (2015).
7. M. A. Perazella, The urine sediment as a biomarker of kidney disease. *Am J Kidney Dis* **66**, 748-755 (2015).
8. E. M. Remer *et al.*, ACR Appropriateness Criteria((R)) on renal failure. *Am J Med* **127**, 1041-1048 e1041 (2014).
9. J. J. Hogan, M. Mocanu, J. S. Berns, The Native Kidney Biopsy: Update and Evidence for Best Practice. *Clin J Am Soc Nephrol* **11**, 354-362 (2016).
10. D. Rosselli, J. D. Rueda, C. E. Diaz, Cost-effectiveness of kidney transplantation compared with chronic dialysis in end-stage renal disease. *Saudi J Kidney Dis Transpl* **26**, 733-738 (2015).
11. P. Martin, P. Errasti, [Kidney transplant]. *An Sist Sanit Navar* **29 Suppl 2**, 79-91 (2006).
12. <https://www.mscbs.gob.es/gabinetePrensa/notaPrensa/pdf/DOSSI180121114055629.pdf>
13. N. R. Brook, S. A. White, J. R. Waller, P. S. Veitch, M. L. Nicholson, Non-heart beating donor kidneys with delayed graft function have superior graft survival compared with conventional heart-beating donor kidneys that develop delayed graft function. *Am J Transplant* **3**, 614-618 (2003).
14. G. Opelz, T. Wujciak, B. Dohler, S. Scherer, J. Mytilineos, HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study. *Rev Immunogenet* **1**, 334-342 (1999).
15. R. N. Foley *et al.*, Mode of dialysis therapy and mortality in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* **9**, 267-276 (1998).
16. J. G. Heaf, H. Lokkegaard, M. Madsen, Initial survival advantage of peritoneal dialysis relative to haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* **17**, 112-117 (2002).
17. J. Swai, X. Zhao, J. R. Noubé, G. Ming, Systematic review and meta-analysis of clinical outcomes comparison between different initial dialysis modalities in end-stage renal disease patients due to lupus nephritis prior to renal transplantation. *BMC Nephrol* **21**, 156 (2020).
18. C. F. Barker, J. F. Markmann, Historical overview of transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**, a014977 (2013).
19. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S. Cellular and Molecular Immunology. 8^o Edition.
20. E. Cozzi, A. Colpo, G. De Silvestro, The mechanisms of rejection in solid organ transplantation. *Transfus Apher Sci* **56**, 498-505 (2017).
21. L. A. Sherman, S. Chattopadhyay, The molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol* **11**, 385-402 (1993).
22. A. Whitelegg, L. D. Barber, The structural basis of T-cell allorecognition. *Tissue Antigens* **63**, 101-108 (2004).
23. N. Safinia, B. Afzali, K. Atalar, G. Lombardi, R. I. Lechler, T-cell alloimmunity and chronic allograft dysfunction. *Kidney Int Suppl*, S2-12 (2010).

24. R. B. Colvin, R. N. Smith, Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol* **5**, 807-817 (2005).
25. W. Liu *et al.*, De novo donor-specific HLA antibodies reduce graft survival rates and increase the risk of kidney transplant rejection: A single-center retrospective study. *Transpl Immunol* **68**, 101430 (2021).
26. A. Loupy *et al.*, Outcome of subclinical antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies. *Am J Transplant* **9**, 2561-2570 (2009).
27. S. DeWolf, M. Sykes, Alloimmune T cells in transplantation. *J Clin Invest* **127**, 2473-2481 (2017).
28. S. D. Ellias, E. L. Larson, T. Taner, S. L. Nyberg, Cell-Mediated Therapies to Facilitate Operational Tolerance in Liver Transplantation. *Int J Mol Sci* **22**, (2021).
29. J. Lu *et al.*, Regulatory T cells induce transplant immune tolerance. *Transpl Immunol* **67**, 101411 (2021).
30. J. Osborn, J. D. Nathan, G. Tiao, M. Alonso, S. Kocoshis, Operational tolerance after pediatric composite liver-pancreas-intestine transplantation following severe graft-versus-host disease. *Pediatr Transplant*, e14069 (2021).
31. P. F. Halloran, Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* **351**, 2715-2729 (2004).
32. M. A. Lim, J. Kohli, R. D. Bloom, Immunosuppression for kidney transplantation: Where are we now and where are we going? *Transplant Rev (Orlando)* **31**, 10-17 (2017).
33. S. J. Chadban *et al.*, KDIGO Clinical Practice Guideline on the Evaluation and Management of Candidates for Kidney Transplantation. *Transplantation* **104**, S11-S103 (2020).
34. N. Bonnefoy-Berard, B. Verrier, C. Vincent, J. P. Revillard, Inhibition of CD25 (IL-2R alpha) expression and T-cell proliferation by polyclonal anti-thymocyte globulins. *Immunology* **77**, 61-67 (1992).
35. N. Bonnefoy-Berard, C. Vincent, J. P. Revillard, Antibodies against functional leukocyte surface molecules in polyclonal antilymphocyte and antithymocyte globulins. *Transplantation* **51**, 669-673 (1991).
36. J. Bell, J. Colaneri, Basiliximab (Simulect): simplifying induction therapy. *Nephrol Nurs J* **27**, 243-244 (2000).
37. S. Chowdhury *et al.*, Induction strategy using basiliximab combined with mycophenolate MMF and immediate low-dose cyclosporin is steroid sparing and more effective than OKT3. *Transplant Proc* **33**, 1057-1058 (2001).
38. S. Gourishankar, P. Turner, P. Halloran, New developments in immunosuppressive therapy in renal transplantation. *Expert Opin Biol Ther* **2**, 483-501 (2002).
39. T. E. Starzl *et al.*, FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation. *Lancet* **2**, 1000-1004 (1989).
40. J. Sanko-Resmer, O. Boillot, P. Wolf, D. Thorburn, Renal function, efficacy and safety postconversion from twice- to once-daily tacrolimus in stable liver recipients: an open-label multicenter study. *Transpl Int* **25**, 283-293 (2012).
41. V. Soontornniyomkij *et al.*, Increased cortical expression of FK506 binding protein-51 in HIV-associated neurocognitive disorders. *J Neurovirol* **18**, 313-322 (2012).
42. Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. *Lancet* **345**, 1321-1325 (1995).
43. D. J. Post, D. D. Douglas, D. C. Mulligan, Immunosuppression in liver transplantation. *Liver Transpl* **11**, 1307-1314 (2005).
44. D. Kim *et al.*, Anti-inflammatory Roles of Glucocorticoids Are Mediated by Foxp3(+) Regulatory T Cells via a miR-342-Dependent Mechanism. *Immunity* **53**, 581-596 e585 (2020).

45. A. C. Wiseman, Immunosuppressive Medications. *Clin J Am Soc Nephrol* **11**, 332-343 (2016).
46. S. Davis, J. E. Cooper, Acute antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients. *Transplant Rev (Orlando)* **31**, 47-54 (2017).
47. N. M. Jasiak, J. M. Park, Immunosuppression in Solid-Organ Transplantation: Essentials and Practical Tips. *Crit Care Nurs Q* **39**, 227-240 (2016).
48. J. A. Fishman, Infection in Organ Transplantation. *Am J Transplant* **17**, 856-879 (2017).
49. M. Fernandez-Ruiz, D. Kumar, A. Humar, Clinical immune-monitoring strategies for predicting infection risk in solid organ transplantation. *Clin Transl Immunology* **3**, e12 (2014).
50. N. C. Issa, J. A. Fishman, Infectious complications of antilymphocyte therapies in solid organ transplantation. *Clin Infect Dis* **48**, 772-786 (2009).
51. J. A. Fishman, R. H. Rubin, Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* **338**, 1741-1751 (1998).
52. B. Krynitz *et al.*, Risk of skin cancer and other malignancies in kidney, liver, heart and lung transplant recipients 1970 to 2008--a Swedish population-based study. *Int J Cancer* **132**, 1429-1438 (2013).
53. G. Tessari *et al.*, Incidence of primary and second cancers in renal transplant recipients: a multicenter cohort study. *Am J Transplant* **13**, 214-221 (2013).
54. C. M. Vajdic *et al.*, Cancer incidence before and after kidney transplantation. *JAMA* **296**, 2823-2831 (2006).
55. D. Collett, L. Mumford, N. R. Banner, J. Neuberger, C. Watson, Comparison of the incidence of malignancy in recipients of different types of organ: a UK Registry audit. *Am J Transplant* **10**, 1889-1896 (2010).
56. J. H. Stewart *et al.*, The pattern of excess cancer in dialysis and transplantation. *Nephrol Dial Transplant* **24**, 3225-3231 (2009).
57. M. D. Navarro *et al.*, Cancer incidence and survival in kidney transplant patients. *Transplant Proc* **40**, 2936-2940 (2008).
58. P. Vigneri, F. Frasca, L. Sciacca, G. Pandini, R. Vigneri, Diabetes and cancer. *Endocr Relat Cancer* **16**, 1103-1123 (2009).
59. W. H. Lim *et al.*, Acute rejection, T-cell-depleting antibodies, and cancer after transplantation. *Transplantation* **97**, 817-825 (2014).
60. E. Au, G. Wong, J. R. Chapman, Cancer in kidney transplant recipients. *Nat Rev Nephrol* **14**, 508-520 (2018).
61. C. M. Vajdic, M. T. van Leeuwen, Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int J Cancer* **125**, 1747-1754 (2009).
62. P. Piselli *et al.*, De novo malignancies after organ transplantation: focus on viral infections. *Curr Mol Med* **13**, 1217-1227 (2013).
63. K. Jiang *et al.*, Cyclosporine A inhibits breast cancer cell growth by downregulating the expression of pyruvate kinase subtype M2. *Int J Mol Med* **30**, 302-308 (2012).
64. R. J. Baker, P. B. Mark, R. K. Patel, K. K. Stevens, N. Palmer, Renal association clinical practice guideline in post-operative care in the kidney transplant recipient. *BMC Nephrol* **18**, 174 (2017).
65. S. A. Acuna *et al.*, Cancer Screening Recommendations for Solid Organ Transplant Recipients: A Systematic Review of Clinical Practice Guidelines. *Am J Transplant* **17**, 103-114 (2017).
66. S. Brouard, J. Ashton-Chess, J. P. Souillou, Surrogate markers for the prediction of long-term outcome in transplantation: Nantes Actualite Transplantation (NAT) 2007 meeting report. *Hum Immunol* **69**, 2-8 (2008).
67. W. Gong, G. H. Witcher, N. Townamchai, X. Xiao, F. Ge, Biomarkers for monitoring therapeutic side effects or various suprathereapeutic confounders after kidney transplantation. *Transplant Proc* **44**, 1265-1269 (2012).

68. F. Ge, Q. Dai, W. Gong, Biomarkers for renal transplantation: where are we? *Int J Nephrol Renovasc Dis* **6**, 187-191 (2013).
69. M. Salvadori, A. Tsalouchos, Biomarkers in renal transplantation: An updated review. *World J Transplant* **7**, 161-178 (2017).
70. N. Lachmann *et al.*, Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Transplantation* **87**, 1505-1513 (2009).
71. M. E. Breimer *et al.*, Multicenter evaluation of a novel endothelial cell crossmatch test in kidney transplantation. *Transplantation* **87**, 549-556 (2009).
72. E. Sanchez-Zapardiel *et al.*, Harmful effect of preformed anti-MICA antibodies on renal allograft evolution in early posttransplantation period. *Transplantation* **96**, 70-78 (2013).
73. H. E. Feucht *et al.*, Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int* **43**, 1333-1338 (1993).
74. S. Mauiyyedi *et al.*, Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* **12**, 574-582 (2001).
75. M. Quaglia, G. Merlotti, G. Guglielmetti, G. Castellano, V. Cantaluppi, Recent Advances on Biomarkers of Early and Late Kidney Graft Dysfunction. *Int J Mol Sci* **21**, (2020).
76. J. A. Bennett, V. S. Rao, M. S. Mitchell, Systemic bacillus Calmette-Guerin (BCG) activates natural suppressor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 5142-5144 (1978).
77. S. C. Buessow, R. D. Paul, D. M. Lopez, Influence of mammary tumor progression on phenotype and function of spleen and in situ lymphocytes in mice. *J Natl Cancer Inst* **73**, 249-255 (1984).
78. M. R. Young, M. Newby, H. T. Wepsic, Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer Res* **47**, 100-105 (1987).
79. B. Almand *et al.*, Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* **166**, 678-689 (2001).
80. D. I. Gabrilovich, M. P. Velders, E. M. Sotomayor, W. M. Kast, Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *J Immunol* **166**, 5398-5406 (2001).
81. S. Kusmartsev, D. I. Gabrilovich, Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression. *Cancer Immunol Immunother* **51**, 293-298 (2002).
82. S. Kusmartsev, S. Nagaraj, D. I. Gabrilovich, Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells. *J Immunol* **175**, 4583-4592 (2005).
83. S. Kusmartsev, Y. Nefedova, D. Yoder, D. I. Gabrilovich, Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J Immunol* **172**, 989-999 (2004).
84. A. C. Ochoa, A. H. Zea, C. Hernandez, P. C. Rodriguez, Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **13**, 721s-726s (2007).
85. L. P. Seung, D. A. Rowley, P. Dubey, H. Schreiber, Synergy between T-cell immunity and inhibition of paracrine stimulation causes tumor rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6254-6258 (1995).
86. D. I. Gabrilovich *et al.*, The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* **67**, 425; author reply 426 (2007).
87. N. R. Monu, A. B. Frey, Myeloid-derived suppressor cells and anti-tumor T cells: a complex relationship. *Immunol Invest* **41**, 595-613 (2012).
88. T. A. Dietlin *et al.*, Mycobacteria-induced Gr-1+ subsets from distinct myeloid lineages have opposite effects on T cell expansion. *J Leukoc Biol* **81**, 1205-1212 (2007).

89. A. Martino *et al.*, Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin vaccination mobilizes innate myeloid-derived suppressor cells restraining in vivo T cell priming via IL-1R-dependent nitric oxide production. *J Immunol* **184**, 2038-2047 (2010).
90. D. D. Anthony *et al.*, Lower peripheral blood CD14+ monocyte frequency and higher CD34+ progenitor cell frequency are associated with HBV vaccine induced response in HIV infected individuals. *Vaccine* **29**, 3558-3563 (2011).
91. A. M. Lesokhin *et al.*, Monocytic CCR2(+) myeloid-derived suppressor cells promote immune escape by limiting activated CD8 T-cell infiltration into the tumor microenvironment. *Cancer Res* **72**, 876-886 (2012).
92. M. J. Delano *et al.*, MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med* **204**, 1463-1474 (2007).
93. Y. Iwata *et al.*, Involvement of CD11b+ GR-1 low cells in autoimmune disorder in MRL-Fas lpr mouse. *Clin Exp Nephrol* **14**, 411-417 (2010).
94. X. Song *et al.*, CD11b+/Gr-1+ immature myeloid cells mediate suppression of T cells in mice bearing tumors of IL-1beta-secreting cells. *J Immunol* **175**, 8200-8208 (2005).
95. D. I. Gabrilovich, S. Nagaraj, Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* **9**, 162-174 (2009).
96. F. Veglia, M. Perego, D. Gabrilovich, Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat Immunol* **19**, 108-119 (2018).
97. V. Bronte *et al.*, Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun* **7**, 12150 (2016).
98. L. Cassetta *et al.*, Deciphering myeloid-derived suppressor cells: isolation and markers in humans, mice and non-human primates. *Cancer Immunol Immunother* **68**, 687-697 (2019).
99. S. Mandruzzato *et al.*, Toward harmonized phenotyping of human myeloid-derived suppressor cells by flow cytometry: results from an interim study. *Cancer Immunol Immunother* **65**, 161-169 (2016).
100. J. R. Mackert *et al.*, Dual negative roles of C/EBPalpha in the expansion and pro-tumor functions of MDSCs. *Sci Rep* **7**, 14048 (2017).
101. I. Marigo *et al.*, Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor. *Immunity* **32**, 790-802 (2010).
102. C. R. Millrud, C. Bergenfelz, K. Leandersson, On the origin of myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget* **8**, 3649-3665 (2017).
103. H. K. Koblish, C. A. Hunter, M. Wysocka, G. Trinchieri, W. M. Lee, Immune suppression by recombinant interleukin (rIL)-12 involves interferon gamma induction of nitric oxide synthase 2 (iNOS) activity: inhibitors of NO generation reveal the extent of rIL-12 vaccine adjuvant effect. *J Exp Med* **188**, 1603-1610 (1998).
104. E. Schouppe *et al.*, Tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subsets exert either inhibitory or stimulatory effects on distinct CD8+ T-cell activation events. *Eur J Immunol* **43**, 2930-2942 (2013).
105. P. C. Rodriguez *et al.*, Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Res* **69**, 1553-1560 (2009).
106. N. V. Rekers *et al.*, Beneficial Immune Effects of Myeloid-Related Proteins in Kidney Transplant Rejection. *Am J Transplant* **16**, 1441-1455 (2016).
107. M. T. Nelp *et al.*, Immune-modulating enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase is effectively inhibited by targeting its apo-form. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 3249-3254 (2018).
108. M. J. Park *et al.*, Interleukin-10 produced by myeloid-derived suppressor cells is critical for the induction of Tregs and attenuation of rheumatoid inflammation in mice. *Sci Rep* **8**, 3753 (2018).

109. C. Cui, P. Lan, L. Fu, The role of myeloid-derived suppressor cells in gastrointestinal cancer. *Cancer Commun (Lond)* **41**, 442-471 (2021).
110. B. A. Norris *et al.*, Chronic but not acute virus infection induces sustained expansion of myeloid suppressor cell numbers that inhibit viral-specific T cell immunity. *Immunity* **38**, 309-321 (2013).
111. P. Qu, C. Yan, J. S. Blum, R. Kapur, H. Du, Myeloid-specific expression of human lysosomal acid lipase corrects malformation and malfunction of myeloid-derived suppressor cells in *lal*^{-/-} mice. *J Immunol* **187**, 3854-3866 (2011).
112. M. Terabe *et al.*, Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J Exp Med* **198**, 1741-1752 (2003).
113. T. Condamine *et al.*, Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Sci Immunol* **1**, (2016).
114. D. I. Gabrilovich, S. Ostrand-Rosenberg, V. Bronte, Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* **12**, 253-268 (2012).
115. L. Dolcetti *et al.*, Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *Eur J Immunol* **40**, 22-35 (2010).
116. K. Movahedi *et al.*, Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* **111**, 4233-4244 (2008).
117. Y. Zhang *et al.*, Human trophoblast cells induced MDSCs from peripheral blood CD14(+) myelomonocytic cells via elevated levels of CCL2. *Cell Mol Immunol* **13**, 615-627 (2016).
118. M. Liu *et al.*, Myeloid-derived suppressor cells regulate the immunosuppressive functions of PD-1(-)PD-L1(+) Bregs through PD-L1/PI3K/AKT/NF-kappaB axis in breast cancer. *Cell Death Dis* **12**, 465 (2021).
119. S. Nagaraj, J. I. Youn, D. I. Gabrilovich, Reciprocal relationship between myeloid-derived suppressor cells and T cells. *J Immunol* **191**, 17-23 (2013).
120. Y. Wang, Y. Ding, N. Guo, S. Wang, MDSCs: Key Criminals of Tumor Pre-metastatic Niche Formation. *Front Immunol* **10**, 172 (2019).
121. S. G. Kalathil, Y. Thanavala, Importance of myeloid derived suppressor cells in cancer from a biomarker perspective. *Cell Immunol* **361**, 104280 (2021).
122. S. Lang *et al.*, Clinical Relevance and Suppressive Capacity of Human Myeloid-Derived Suppressor Cell Subsets. *Clin Cancer Res* **24**, 4834-4844 (2018).
123. H. J. Lee *et al.*, Glucocorticoids induce corneal allograft tolerance through expansion of monocytic myeloid-derived suppressor cells. *Am J Transplant* **18**, 3029-3037 (2018).
124. M. R. Garcia *et al.*, Monocytic suppressive cells mediate cardiovascular transplantation tolerance in mice. *J Clin Invest* **120**, 2486-2496 (2010).
125. Y. He, J. Bei, H. Zeng, Z. Pan, The roles of sepsis-induced myeloid derived suppressor cells in mice corneal, skin and combined transplantation. *Transpl Immunol* **34**, 8-13 (2016).
126. N. Dilek *et al.*, Control of transplant tolerance and intragraft regulatory T cell localization by myeloid-derived suppressor cells and CCL5. *J Immunol* **188**, 4209-4216 (2012).
127. A. S. Dugast *et al.*, Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *J Immunol* **180**, 7898-7906 (2008).
128. B. D. Hock *et al.*, Renal transplant recipients have elevated frequencies of circulating myeloid-derived suppressor cells. *Nephrol Dial Transplant* **27**, 402-410 (2012).
129. Y. Luan *et al.*, Monocytic myeloid-derived suppressor cells accumulate in renal transplant patients and mediate CD4(+) Foxp3(+) Treg expansion. *Am J Transplant* **13**, 3123-3131 (2013).

130. F. Meng *et al.*, Clinical significance of myeloid-derived suppressor cells in human renal transplantation with acute T cell-mediated rejection. *Inflammation* **37**, 1799-1805 (2014).
131. B. D. Hock, J. L. McKenzie, N. B. Cross, M. J. Currie, Dynamic changes in myeloid derived suppressor cell subsets following renal transplant: A prospective study. *Transpl Immunol* **32**, 164-171 (2015).
132. X. X. Du *et al.*, Accumulation of High Levels of Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Enhances Graft Survival in Almost-Tolerant Kidney Transplant Recipients. *Transplant Proc* **50**, 3314-3320 (2018).
133. M. Ruterbusch, K. B. Pruner, L. Shehata, M. Pepper, In Vivo CD4(+) T Cell Differentiation and Function: Revisiting the Th1/Th2 Paradigm. *Annu Rev Immunol* **38**, 705-725 (2020).
134. I. A. Paiva, J. Badolato-Correa, D. Familiar-Macedo, L. M. de-Oliveira-Pinto, Th17 Cells in Viral Infections-Friend or Foe? *Cells* **10**, (2021).
135. E. C. Sayitoglu, R. A. Freeborn, M. G. Roncarolo, The Yin and Yang of Type 1 Regulatory T Cells: From Discovery to Clinical Application. *Front Immunol* **12**, 693105 (2021).
136. S. Crotty, T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* **41**, 529-542 (2014).
137. R. Goenka *et al.*, Cutting edge: dendritic cell-restricted antigen presentation initiates the follicular helper T cell program but cannot complete ultimate effector differentiation. *J Immunol* **187**, 1091-1095 (2011).
138. A. Ballesteros-Tato, T. D. Randall, Priming of T follicular helper cells by dendritic cells. *Immunol Cell Biol* **92**, 22-27 (2014).
139. Y. S. Choi *et al.*, ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity* **34**, 932-946 (2011).
140. Y. S. Choi *et al.*, Bcl6 expressing follicular helper CD4 T cells are fate committed early and have the capacity to form memory. *J Immunol* **190**, 4014-4026 (2013).
141. J. Hu, C. Havenar-Daughton, S. Crotty, Modulation of SAP dependent T:B cell interactions as a strategy to improve vaccination. *Curr Opin Virol* **3**, 363-370 (2013).
142. Z. Shulman *et al.*, T follicular helper cell dynamics in germinal centers. *Science* **341**, 673-677 (2013).
143. L. M. Tsai, D. Yu, Follicular helper T-cell memory: establishing new frontiers during antibody response. *Immunol Cell Biol* **92**, 57-63 (2014).
144. J. He *et al.*, Circulating precursor CCR7(lo)PD-1(hi) CXCR5(+) CD4(+) T cells indicate Tfh cell activity and promote antibody responses upon antigen reexposure. *Immunity* **39**, 770-781 (2013).
145. R. Morita *et al.*, Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* **34**, 108-121 (2011).
146. J. Sellares *et al.*, Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant* **12**, 388-399 (2012).
147. J. Shi *et al.*, Increased circulating follicular helper T cells with decreased programmed death-1 in chronic renal allograft rejection. *BMC Nephrol* **16**, 182 (2015).
148. G. N. de Graav *et al.*, Follicular T helper cells and humoral reactivity in kidney transplant patients. *Clin Exp Immunol* **180**, 329-340 (2015).
149. A. Chenouard *et al.*, Renal Operational Tolerance Is Associated With a Defect of Blood Tfh Cells That Exhibit Impaired B Cell Help. *Am J Transplant* **17**, 1490-1501 (2017).
150. F. L. Cano-Romero *et al.*, Longitudinal profile of circulating T follicular helper lymphocytes parallels anti-HLA sensitization in renal transplant recipients. *Am J Transplant* **19**, 89-97 (2019).

151. R. Ahmed, D. Gray, Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* **272**, 54-60 (1996).
152. L. Mesin, J. Ersching, G. D. Victora, Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity* **45**, 471-482 (2016).
153. C. Mauri, A. Bosma, Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol* **30**, 221-241 (2012).
154. M. Menon, P. A. Blair, D. A. Isenberg, C. Mauri, A Regulatory Feedback between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity* **44**, 683-697 (2016).
155. E. C. Rosser *et al.*, Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1beta and interleukin-6 production. *Nat Med* **20**, 1334-1339 (2014).
156. M. Matsumoto *et al.*, Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity* **41**, 1040-1051 (2014).
157. A. Yoshizaki *et al.*, Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature* **491**, 264-268 (2012).
158. B. Stanic *et al.*, IL-10-overexpressing B cells regulate innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol* **135**, 771-780 e778 (2015).
159. C. J. M. Piper *et al.*, Aryl Hydrocarbon Receptor Contributes to the Transcriptional Program of IL-10-Producing Regulatory B Cells. *Cell Rep* **29**, 1878-1892 e1877 (2019).
160. C. M. Fehres *et al.*, APRIL Induces a Novel Subset of IgA(+) Regulatory B Cells That Suppress Inflammation via Expression of IL-10 and PD-L1. *Front Immunol* **10**, 1368 (2019).
161. K. Jansen *et al.*, Regulatory B cells, A to Z. *Allergy*, (2021).
162. N. A. Carter *et al.*, Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J Immunol* **186**, 5569-5579 (2011).
163. C. Mauri, D. Gray, N. Mushtaq, M. Londei, Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med* **197**, 489-501 (2003).
164. P. A. Blair *et al.*, Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice. *J Immunol* **182**, 3492-3502 (2009).
165. Z. Xiao *et al.*, Inhibition of Fas ligand in NOD mice unmask a protective role for IL-10 against insulinitis development. *Am J Pathol* **179**, 725-732 (2011).
166. D. Maseda *et al.*, Peritoneal cavity regulatory B cells (B10 cells) modulate IFN-gamma+CD4+ T cell numbers during colitis development in mice. *J Immunol* **191**, 2780-2795 (2013).
167. S. Fillatreau, C. H. Sweenie, M. J. McGeachy, D. Gray, S. M. Anderton, B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* **3**, 944-950 (2002).
168. G. Jin *et al.*, B-cell linker protein expression contributes to controlling allergic and autoimmune diseases by mediating IL-10 production in regulatory B cells. *J Allergy Clin Immunol* **131**, 1674-1682 (2013).
169. R. Watanabe *et al.*, Regulatory B cells (B10 cells) have a suppressive role in murine lupus: CD19 and B10 cell deficiency exacerbates systemic autoimmunity. *J Immunol* **184**, 4801-4809 (2010).
170. W. Chen *et al.*, Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* **198**, 1875-1886 (2003).
171. V. V. Parekh *et al.*, B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8+ T cells: role of TGF-beta 1. *J Immunol* **170**, 5897-5911 (2003).
172. K. Bjarnadottir *et al.*, B cell-derived transforming growth factor-beta1 expression limits the induction phase of autoimmune neuroinflammation. *Sci Rep* **6**, 34594 (2016).

173. M. Damo, N. S. Joshi, Treg cell IL-10 and IL-35 exhaust CD8(+) T cells in tumors. *Nat Immunol* **20**, 674-675 (2019).
174. X. Liu, H. Ren, H. Guo, W. Wang, N. Zhao, Interleukin-35 has a tumor-promoting role in hepatocellular carcinoma. *Clin Exp Immunol* **203**, 219-229 (2021).
175. Y. Ma *et al.*, Elevated level of interleukin-35 in colorectal cancer induces conversion of T cells into iTreg by activating STAT1/STAT3. *Oncotarget* **7**, 73003-73015 (2016).
176. P. B. Olkhanud *et al.*, Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4(+) T cells to T-regulatory cells. *Cancer Res* **71**, 3505-3515 (2011).
177. C. R. Yu, J. K. Choi, A. N. Uche, C. E. Ekwuagu, Production of IL-35 by Bregs is mediated through binding of BATF-IRF-4-IRF-8 complex to il12a and ebi3 promoter elements. *J Leukoc Biol* **104**, 1147-1157 (2018).
178. M. S. Buzza, P. I. Bird, Extracellular granzymes: current perspectives. *Biol Chem* **387**, 827-837 (2006).
179. J. G. Evans *et al.*, Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J Immunol* **178**, 7868-7878 (2007).
180. A. Mizoguchi, E. Mizoguchi, H. Takedatsu, R. S. Blumberg, A. K. Bhan, Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity* **16**, 219-230 (2002).
181. D. Catalan *et al.*, Immunosuppressive Mechanisms of Regulatory B Cells. *Front Immunol* **12**, 611795 (2021).
182. A. Bosma, A. Abdel-Gadir, D. A. Isenberg, E. C. Jury, C. Mauri, Lipid-antigen presentation by CD1d(+) B cells is essential for the maintenance of invariant natural killer T cells. *Immunity* **36**, 477-490 (2012).
183. E. R. Zacca *et al.*, PD-L1(+) Regulatory B Cells Are Significantly Decreased in Rheumatoid Arthritis Patients and Increase After Successful Treatment. *Front Immunol* **9**, 2241 (2018).
184. H. Nagafuchi *et al.*, Aberrant expression of Fas ligand on anti-DNA autoantibody secreting B lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus: "immune privilege"-like state of the autoreactive B cells. *Clin Exp Rheumatol* **20**, 625-631 (2002).
185. A. Saxena, H. Yagita, T. W. Donner, A. R. A. Hamad, Expansion of FasL-Expressing CD5(+) B Cells in Type 1 Diabetes Patients. *Front Immunol* **8**, 402 (2017).
186. J. H. Meyers, C. A. Sabatos, S. Chakravarti, V. K. Kuchroo, The TIM gene family regulates autoimmune and allergic diseases. *Trends Mol Med* **11**, 362-369 (2005).
187. K. M. Lee *et al.*, Anti-CD45RB/anti-TIM-1-induced tolerance requires regulatory B cells. *Am J Transplant* **12**, 2072-2078 (2012).
188. S. Li *et al.*, Identification of the Subsets of IL-10-Producing Regulatory B Cells in the Course of Tolerance Induction and Maintenance in Islet Allograft Transplantation. *Transplant Proc* **50**, 3900-3905 (2018).
189. Y. Iwata *et al.*, Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* **117**, 530-541 (2011).
190. P. A. Blair *et al.*, CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* **32**, 129-140 (2010).
191. J. Li *et al.*, Inhibition of Glycogen Synthase Kinase 3beta Increases the Proportion and Suppressive Function of CD19(+)CD24(hi)CD27(+) Breg Cells. *Front Immunol* **11**, 603288 (2020).
192. K. Oleinika, C. Mauri, A. D. Salama, Effector and regulatory B cells in immune-mediated kidney disease. *Nat Rev Nephrol* **15**, 11-26 (2019).
193. K. A. Newell *et al.*, Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* **120**, 1836-1847 (2010).

194. A. Cherukuri *et al.*, Immunologic human renal allograft injury associates with an altered IL-10/TNF-alpha expression ratio in regulatory B cells. *J Am Soc Nephrol* **25**, 1575-1585 (2014).
195. S. Shabir *et al.*, Transitional B lymphocytes are associated with protection from kidney allograft rejection: a prospective study. *Am J Transplant* **15**, 1384-1391 (2015).
196. A. Hart *et al.*, OPTN/SRTR 2018 Annual Data Report: Kidney. *Am J Transplant* **20 Suppl s1**, 20-130 (2020).
197. R. Zhang *et al.*, Expanded CD14(hi)CD16(-) Immunosuppressive Monocytes Predict Disease Severity in Patients with Acute Pancreatitis. *J Immunol* **202**, 2578-2584 (2019).
198. Y. Suk Lee *et al.*, Myeloid-derived suppressor cells are bound and inhibited by anti-thymocyte globulin. *Innate Immun* **25**, 46-59 (2019).
199. V. L. Chiasson *et al.*, Myeloid-Derived Suppressor Cells Ameliorate Cyclosporine A-Induced Hypertension in Mice. *Hypertension* **71**, 199-207 (2018).
200. C. Han *et al.*, The effect of immunosuppressive drug cyclosporine A on myeloid-derived suppressor cells in transplanted mice. *Inflamm Res* **65**, 679-688 (2016).
201. H. H. Yan *et al.*, Gr-1+CD11b+ myeloid cells tip the balance of immune protection to tumor promotion in the premetastatic lung. *Cancer Res* **70**, 6139-6149 (2010).
202. F. A. Frohlich *et al.*, De-novo malignancies after kidney transplantation: A long-term observational study. *PLoS One* **15**, e0242805 (2020).
203. J. Dantal *et al.*, Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. *Lancet* **351**, 623-628 (1998).
204. A. E. Grulich, M. T. van Leeuwen, M. O. Falster, C. M. Vajdic, Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet* **370**, 59-67 (2007).
205. M. T. van Leeuwen *et al.*, Effect of reduced immunosuppression after kidney transplant failure on risk of cancer: population based retrospective cohort study. *BMJ* **340**, c570 (2010).
206. E. C. Hall, E. A. Engels, R. M. Pfeiffer, D. L. Segev, Association of antibody induction immunosuppression with cancer after kidney transplantation. *Transplantation* **99**, 1051-1057 (2015).
207. G. Opelz, C. Naujokat, V. Daniel, P. Terness, B. Dohler, Disassociation between risk of graft loss and risk of non-Hodgkin lymphoma with induction agents in renal transplant recipients. *Transplantation* **81**, 1227-1233 (2006).
208. M. Fernandez-Ruiz *et al.*, Assessing the risk of de novo malignancy in kidney transplant recipients: role for monitoring of peripheral blood lymphocyte populations. *Transplantation* **98**, e36-37 (2014).
209. C. M. Hope *et al.*, Peripheral natural killer cell and allo-stimulated T-cell function in kidney transplant recipients associate with cancer risk and immunosuppression-related complications. *Kidney Int* **88**, 1374-1382 (2015).
210. M. J. Bottomley, P. N. Harden, K. J. Wood, CD8+ Immunosenescence Predicts Post-Transplant Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in High-Risk Patients. *J Am Soc Nephrol* **27**, 1505-1515 (2016).
211. R. P. Carroll *et al.*, Immune phenotype predicts risk for posttransplantation squamous cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol* **21**, 713-722 (2010).
212. C. M. Hope *et al.*, The immune phenotype may relate to cancer development in kidney transplant recipients. *Kidney Int* **86**, 175-183 (2014).
213. S. Okano *et al.*, Myeloid-derived suppressor cells increase and inhibit donor-reactive T cell responses to graft intestinal epithelium in intestinal transplant patients. *Am J Transplant* **18**, 2544-2558 (2018).
214. W. C. Lee *et al.*, Immunological discrepancy in aged mice facilitates skin allograft survival. *Aging (Albany NY)* **13**, 16219-16228 (2021).

215. J. M. Ju *et al.*, IDO1 scavenges reactive oxygen species in myeloid-derived suppressor cells to prevent graft-versus-host disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **118**, (2021).
216. J. Li *et al.*, The mTOR Deficiency in Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Protects Mouse Cardiac Allografts by Inducing Allograft Tolerance. *Front Immunol* **12**, 661338 (2021).
217. K. Fujimoto *et al.*, Analysis of therapeutic potential of monocytic myeloid-derived suppressor cells in cardiac allotransplantation. *Transpl Immunol* **67**, 101405 (2021).
218. J. Zhu *et al.*, Ex Vivo-Induced Bone Marrow-Derived Myeloid Suppressor Cells Prevent Corneal Allograft Rejection in Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **62**, 3 (2021).
219. H. Liu *et al.*, Monocytic MDSC mobilization promotes tumor recurrence after liver transplantation via CXCL10/TLR4/MMP14 signaling. *Cell Death Dis* **12**, 489 (2021).
220. M. C. Schmid *et al.*, Integrin CD11b activation drives anti-tumor innate immunity. *Nat Commun* **9**, 5379 (2018).
221. D. W. Beury *et al.*, Cross-talk among myeloid-derived suppressor cells, macrophages, and tumor cells impacts the inflammatory milieu of solid tumors. *J Leukoc Biol* **96**, 1109-1118 (2014).
222. S. L. Highfill *et al.*, Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. *Blood* **116**, 5738-5747 (2010).
223. J. I. Youn, D. I. Gabrilovich, The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *Eur J Immunol* **40**, 2969-2975 (2010).
224. P. Sinha, V. K. Clements, S. K. Bunt, S. M. Albelda, S. Ostrand-Rosenberg, Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J Immunol* **179**, 977-983 (2007).
225. S. E. Lee *et al.*, Matrix Metalloproteinase-9 in Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Correlate with Early Infections and Clinical Outcomes in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* **24**, 32-42 (2018).
226. W. Zhang, S. Liang, J. Wu, A. Horuzsko, Human inhibitory receptor immunoglobulin-like transcript 2 amplifies CD11b+Gr1+ myeloid-derived suppressor cells that promote long-term survival of allografts. *Transplantation* **86**, 1125-1134 (2008).
227. V. De Wilde *et al.*, Endotoxin-induced myeloid-derived suppressor cells inhibit alloimmune responses via heme oxygenase-1. *Am J Transplant* **9**, 2034-2047 (2009).
228. C. Di Giacomo *et al.*, Nonproteic antioxidant status in plasma of subjects with colon cancer. *Exp Biol Med (Maywood)* **228**, 525-528 (2003).
229. S. D. Korde, A. Basak, M. Chaudhary, M. Goyal, A. Vagga, Enhanced nitrosative and oxidative stress with decreased total antioxidant capacity in patients with oral precancer and oral squamous cell carcinoma. *Oncology* **80**, 382-389 (2011).
230. A. Cherukuri *et al.*, Reduced human transitional B cell T1/T2 ratio is associated with subsequent deterioration in renal allograft function. *Kidney Int* **91**, 183-195 (2017).
231. G. Cobo, B. Lindholm, P. Stenvinkel, Chronic inflammation in end-stage renal disease and dialysis. *Nephrol Dial Transplant* **33**, iii35-iii40 (2018).
232. A. Ramezani, D. S. Raj, The gut microbiome, kidney disease, and targeted interventions. *J Am Soc Nephrol* **25**, 657-670 (2014).
233. M. G. Betjes, A. W. Langerak, A. van der Spek, E. A. de Wit, N. H. Litjens, Premature aging of circulating T cells in patients with end-stage renal disease. *Kidney Int* **80**, 208-217 (2011).
234. S. Kato *et al.*, Aspects of immune dysfunction in end-stage renal disease. *Clin J Am Soc Nephrol* **3**, 1526-1533 (2008).
235. P. Sagoo *et al.*, Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* **120**, 1848-1861 (2010).

236. P. E. Cippa *et al.*, A late B lymphocyte action in dysfunctional tissue repair following kidney injury and transplantation. *Nat Commun* **10**, 1157 (2019).
237. I. Rebollo-Mesa *et al.*, Biomarkers of Tolerance in Kidney Transplantation: Are We Predicting Tolerance or Response to Immunosuppressive Treatment? *Am J Transplant* **16**, 3443-3457 (2016).
238. I. Latorre *et al.*, Calcineurin and mTOR inhibitors have opposing effects on regulatory T cells while reducing regulatory B cell populations in kidney transplant recipients. *Transpl Immunol* **35**, 1-6 (2016).
239. S. Servais *et al.*, Impact of Pre-Transplant Anti-T Cell Globulin (ATG) on Immune Recovery after Myeloablative Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation. *PLoS One* **10**, e0130026 (2015).
240. Q. Tang *et al.*, Altered balance between effector T cells and FOXP3+ HELIOS+ regulatory T cells after thymoglobulin induction in kidney transplant recipients. *Transpl Int* **25**, 1257-1267 (2012).
241. R. Valdez-Ortiz *et al.*, Induction of suppressive allogeneic regulatory T cells via rabbit antithymocyte polyclonal globulin during homeostatic proliferation in rat kidney transplantation. *Transpl Int* **28**, 108-119 (2015).
242. M. R. Clatworthy *et al.*, B-cell-depleting induction therapy and acute cellular rejection. *N Engl J Med* **360**, 2683-2685 (2009).
243. C. Wiebe *et al.*, Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant* **12**, 1157-1167 (2012).
244. H. Zhou *et al.*, The proportion of CD19(+)CD24(hi)CD27(+) regulatory B cells predicts the occurrence of acute allograft rejection in liver transplantation. *Ann Transl Med* **7**, 465 (2019).
245. E. H. Ibrahim *et al.*, Higher CD19+CD25(+) Bregs are independently associated with better graft function in renal transplant recipients. *BMC Nephrol* **22**, 180 (2021).
246. E. H. Ibrahim *et al.*, Relationship of transitional regulatory B and regulatory T cells and immunosuppressive drug doses in stable renal transplant recipients. *Immun Inflamm Dis*, (2021).
247. A. Achour *et al.*, Human regulatory B cells control the TFH cell response. *J Allergy Clin Immunol* **140**, 215-222 (2017).
248. A. R. Khan *et al.*, PD-L1hi B cells are critical regulators of humoral immunity. *Nat Commun* **6**, 5997 (2015).
249. P. T. Sage *et al.*, Dendritic Cell PD-L1 Limits Autoimmunity and Follicular T Cell Differentiation and Function. *J Immunol* **200**, 2592-2602 (2018).
250. J. Jaufmann *et al.*, Human monocytic myeloid-derived suppressor cells impair B-cell phenotype and function in vitro. *Eur J Immunol* **50**, 33-47 (2020).
251. B. Ozkan, H. Lim, S. G. Park, Immunomodulatory Function of Myeloid-Derived Suppressor Cells during B Cell-Mediated Immune Responses. *Int J Mol Sci* **19**, (2018).
252. A. Pennati, S. Asress, J. D. Glass, J. Galipeau, Adoptive transfer of IL-10(+) regulatory B cells decreases myeloid-derived macrophages in the central nervous system in a transgenic amyotrophic lateral sclerosis model. *Cell Mol Immunol* **15**, 727-730 (2018).
253. M. J. Park *et al.*, Myeloid-Derived Suppressor Cells Induce the Expansion of Regulatory B Cells and Ameliorate Autoimmunity in the Sanroque Mouse Model of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol* **68**, 2717-2727 (2016).