

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Departamento de Medicina

---



**Inhibidores de la vía PI3K/Akt/mTOR: utilidad  
en la profilaxis/tratamiento de la enfermedad  
injerto contra huésped.**

**Maria del Carmen Herrero Sánchez**

2015





Universidad de Salamanca  
Departamento de Medicina

**D<sup>a</sup>. BELEN BLANCO DURANGO, DOCTORA EN BIOLOGÍA POR LA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID.**

**CERTIFICO:**

Que el presente trabajo titulado **"Inhibidores de la vía PI3K/AKT/mTOR: utilidad en la profilaxis/tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped"** ha sido realizado bajo mi dirección por la licenciada Maria del Carmen Herrero Sánchez en el Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca, y reúne a mi juicio las condiciones de originalidad requeridas para optar al Grado de Doctora de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo la siguiente certificación en  
Salamanca a 25 de marzo de 2015

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Blanco Durango', with a long horizontal line extending to the right.

Fdo. Dr<sup>a</sup>. D<sup>a</sup>. **Belén Blanco Durango**





Universidad de Salamanca  
Departamento de Medicina

**D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> CONSUELO DEL CAÑIZO FERNÁNDEZ-ROLDÁN, PROFESORA  
TITULAR DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,**

**CERTIFICO:**

Que el presente trabajo titulado **"Inhibidores de la vía PI3K/AKT/mTOR: utilidad en la profilaxis/tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped"** ha sido realizado bajo mi dirección por la licenciada Maria del Carmen Herrero Sánchez en el Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca, y reúne a mi juicio las condiciones de originalidad requeridas para optar al Grado de Doctora de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo la siguiente certificación en  
Salamanca a 25 de marzo de 2015

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. del Cañizo', written over the printed name below.

Fdo. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. D<sup>a</sup>. **María Consuelo del Cañizo Fernández-Roldán**



# **AGRADECIMIENTOS**



*A mi familia, amigos y compañeros de trabajo*



# **ABREVIATURAS**



|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| <b>4E-BP1</b>                   | Proteína de unión al factor de iniciación eucariota 4E-1 (del inglés, <i>eukaryotic Initiator factor 4E binding protein 1</i> ) |
| <b>AcMo</b>                     | Anticuerpo monoclonal   |
| <b>Ag</b>                       | Antígeno  |
| <b>aloTPH</b>                   | Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos  |
| <b>AP-1</b>                     | Proteína activadora 1 (del inglés, <i>activator protein 1</i> )   |
| <b>APCs</b>                     | Células presentadoras de antígenos (del inglés, <i>antigen presenting cells</i> )   |
| <b>ARNm</b>                     | ARN mensajero   |
| <b>ATG</b>                      | Globulina antitimocítica (del inglés, <i>antithymocyte globulin</i> )   |
| <b>CCI-779</b>                  | Temsirolimus  |
| <b>CDKs</b>                     | Quinasas dependientes de ciclinas (del inglés, <i>cyclin dependent kinases</i> )  |
| <b>CMNs</b>                     | Células mononucleares   |
| <b>CMV</b>                      | Citomegalovirus   |
| <b>CsA</b>                      | Ciclosporina A  |
| <b>DAG</b>                      | Diacilglicerol  |
| <b>EICH</b>                     | Enfermedad injerto contra hospedador  |
| <b>EICHa</b>                    | EICH aguda  |
| <b>EICHc</b>                    | EICH crónica  |
| <b>EICL</b>                     | Efecto injerto contra leucemia  |
| <b>EICT</b>                     | Efecto injerto contra tumor   |
| <b>eIF4E</b>                    | Factor de iniciación eucariota 4E (del inglés, <i>eukaryotic Initiator factor 4E</i> )  |
| <b>eIF4F</b>                    | Factor de iniciación eucariota 4F (del inglés, <i>eukaryotic Initiator factor 4F</i> )  |
| <b>EOMES</b>                    | Eomesodermina   |
| <b>ERK</b>                      | Quinasa reguladora de señales extracelulares (del inglés, <i>extracellular-signal-regulated kinase</i> )                        |
| <b>FKBP12</b>                   | Proteína de unión a FK506 (del inglés, <i>12-kDa FK506-binding protein</i> )  |
| <b>FoxO</b>                     | (del inglés <i>forkhead box O</i> )   |
| <b>FOXP3</b>                    | (del inglés <i>forkhead box P3</i> )  |
| <b>GATA-3</b>                   | Proteína 3 de unión a GATA (del inglés, <i>GATA binding protein 3</i> )   |
| <b>HLA</b>                      | Antígeno leucocitario humano (del inglés, <i>human leukocyte antigen</i> )  |
| <b>IgG</b>                      | Inmunoglobulina G   |
| <b>IgM</b>                      | Inmunoglobulina M   |
| <b>IL</b>                       | Interleucina  |
| <b>IL-2R<math>\alpha</math></b> | Cadena alfa del receptor de IL-2 (del inglés, <i>interleukin 2 receptor alpha chain</i> )                                       |
| <b>INF-<math>\gamma</math></b>  | Interferón gamma  |

|               |   |
|---------------|---|
| <b>JAK</b>    | Quinasa Janus (del inglés, <i>Janus kinase</i> )  |
| <b>MEK</b>    | Quinasa activada por mitógenos (del inglés, <i>mitogen activated kinase</i> )   |
| <b>mHA</b>    | Antígeno menor de histocompatibilidad (del inglés, <i>minor histocompatibility antigen</i> )  |
| <b>MHC</b>    | Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés, <i>major histocompatibility complex</i> )  |
| <b>MIF</b>    | Mediana de intensidad de fluorescencia  |
| <b>MMF</b>    | mofetil micofenolato  |
| <b>MO</b>     | médula ósea   |
| <b>mTOR</b>   | Diana de rapamicina en mamíferos (del inglés, <i>mammalian target of rapamycin</i> )  |
| <b>mTORC1</b> | Complejo mTOR de tipo 1 (del inglés, <i>mTOR complex 1</i> )  |
| <b>mTORC2</b> | Complejo mTOR de tipo 2 (del inglés, <i>mTOR complex 2</i> )  |
| <b>MTX</b>    | metotrexato   |
| <b>NF-κB</b>  | Factor nuclear kappa-B (del inglés, <i>nuclear factor kappa-B</i> )   |
| <b>NFAT</b>   | Factor nuclear de las células T activadas (del inglés, <i>nuclear factor of activated T-cells</i> )   |
| <b>NK</b>     | Células asesinas naturales (del inglés, <i>natural killer</i> )   |
| <b>p70S6K</b> | 70-kDa proteína quinasa S6 o proteína quinasa S6 (del inglés, <i>70-kda s6 protein kinase o s6 protein kinase</i> )                               |
| <b>PDK1</b>   | Proteína quinasa dependiente de 3-fosfoinositol (del inglés, <i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1</i> )                               |
| <b>PHA</b>    | Fitohemaglutinina (del inglés, <i>phytohemagglutinin</i> )  |
| <b>PI3K</b>   | Fosfatidilinositol 3 quinasa (del inglés, <i>phosphatidylinositol-3-Kinase</i> )  |
| <b>PIP3</b>   | Fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato (del inglés, <i>phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate</i> )  |
| <b>PKC</b>    | Proteína quinasa C (del inglés, <i>protein kinase C</i> )   |
| <b>PMA</b>    | Forbol miristato acetato (del inglés, <i>phorbol myristate acetate</i> )  |
| <b>RAD001</b> | Everolimus  |
| <b>RORγt</b>  | Receptor nuclear huérfano relacionado con el ácido retinoico gamma t (del inglés, <i>retinoid-acid receptor-related orphan receptor gamma t</i> ) |
| <b>rpS6</b>   | Proteína ribosomal S6 (del inglés, <i>ribosomal protein S6</i> )  |
| <b>RTK</b>    | Receptores tirosina quinasa (del inglés, <i>receptor tyrosine kinase</i> )  |
| <b>SGK</b>    | Quinasa regulada por suero y glucocorticoides (del inglés, <i>serum- and Glucocorticoid-induced protein kinase</i> )                              |
| <b>STAT</b>   | Transductores de señales y activadores de la transcripción (del inglés, <i>signal</i> )   |

*transducer and activator of transcription)*

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b>TAC</b>                     | Tacrolimus   |
| <b>TCR</b>                     | Receptor de célula T (del inglés, <i>T cell receptor</i> )                                     |
| <b>TGF-<math>\beta</math></b>  | Factor de crecimiento transformante beta (del inglés, <i>transforming growth factor beta</i> ) |
| <b>Th</b>                      | Células T colaboradoras o helper   |
| <b>T<sub>MC</sub></b>          | Células T de memoria central   |
| <b>T<sub>ME</sub></b>          | Células T de memoria efectora  |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Factor de necrosis tumoral alpha (del inglés, <i>tumor necrosis factor alpha</i> )             |
| <b>Treg</b>                    | Células T reguladoras naturales CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup>          |
| <b>TSC2</b>                    | Factor de crecimiento transformante beta (del inglés, <i>tuberous sclerosis complex 2</i> )    |



# ÍNDICE



|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUCCIÓN.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1. TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES</b>                         |           |
| <b>HEMATOPOYÉTICOS.....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>2. ENFERMEDAD INJERTO CONTRA HUÉSPED Y CÉLULAS T.....</b>           | <b>3</b>  |
| <b>2.1 EICH aguda y EICH crónica: fisiopatología y manifestaciones</b> |           |
| <b>clínicas.....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>2.1.1 EICH aguda.....</b>   |           |
| <b>2.1.2 EICH crónica.....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>2.2 Células T y alorreconocimiento.....</b>                         | <b>5</b>  |
| <b>2.2.1 Sistema HLA.....</b>  | <b>6</b>  |
| <b>2.2.2 Células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>.....</b>          | <b>7</b>  |
| <b>2.3 Estrategias de profilaxis de EICH.....</b>                      | <b>8</b>  |
| <b>3. ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T.....</b>                          | <b>9</b>  |
| <b>4. RUTA PI3K/Akt/mTOR.....</b>                                      | <b>11</b> |
| <b>Ruta PI3K/Akt/mTOR en linfocitos T.....</b>                         | <b>14</b> |
| <b>5. INHIBIDORES DE LA RUTA PI3K/Akt/mTOR.....</b>                    | <b>17</b> |
| <b>5.1 Rapamicina.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>5.1.1 Actividad inmunosupresora.....</b>                            | <b>18</b> |
| <b>5.1.2 Actividad antitumoral.....</b>                                | <b>19</b> |
| <b>5.2 Inhibidor de mTORC1 y mTORC2.....</b>                           | <b>19</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| 5.3 NVP-BKM120.....  | 20        |
| 5.4 Inhibidor de PI3K/mTOR.....  | 20        |
| <b>HIPÓTESIS.....</b>  | <b>23</b> |
| <b>OBJETIVOS.....</b>  | <b>27</b> |
| <b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>   | <b>31</b> |
| <b>1. MATERIAL.....</b>  | <b>33</b> |
| 1.1 Estudios <i>in vitro</i> .....   | 33        |
| 1.1.1 Células.....   | 33        |
| 1.1.2 Fármacos y disolventes.....  | 33        |
| 1.2 Estudios <i>in vivo</i> .....  | 34        |
| 1.2.1 Animales.....  | 34        |
| 1.2.2 Fármacos y disolventes.....  | 34        |
| <b>2. MÉTODOS.....</b>   | <b>34</b> |
| 2.1 Estudios <i>in vitro</i> .....   | 34        |
| 2.1.1 Aislamiento y cultivo de células mononucleares y<br>linfocitos T.....                        | 34        |
| 2.1.2 Estudio de viabilidad/proliferación celular. Ensayo<br><i>MTT</i> .....                      | 36        |
| 2.1.3 Estudios de fosforilación de proteínas y activación de<br>caspa 3 mediante western blot..... | 37        |
| 2.1.4 Estudios de proliferación.....   | 39        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.1.5 Estudios de ciclo celular.....   | 40        |
| 2.1.6 Estudios de apoptosis por citometría de flujo.....   | 41        |
| 2.1.7 Estudio de citoquinas.....   | 41        |
| 2.1.8 Estudios de fenotipo y marcadores de activación de<br>linfocitos T.....  | 42        |
| 2.1.9 Detección de células secretoras de IFN- $\gamma$ mediante ELISPOT.....   | 43        |
| <b>2.2 Estudios <i>in vivo</i>.....</b>  | <b>45</b> |
| 2.2.1 Irradiación y trasplante.....  | 45        |
| 2.2.2 Grupos experimentales.....   | 46        |
| 2.2.3 Administración de los fármacos.....  | 47        |
| 2.2.4 Monitorización.....  | 48        |
| 2.2.5 Examen histopatológico de tejidos.....   | 48        |
| <b>2.3 Análisis estadístico.....</b>   | <b>49</b> |
| <b>RESULTADOS.....</b>   | <b>51</b> |
| <b>1. Establecimiento de la dosis de los inhibidores de la ruta<br/>PI3K/Akt/mTOR.....</b>                                   | <b>53</b> |
| <b>2. IMM, IPM, BKM120 y rapamicina bloquean la fosforilación de<br/>proteínas de la ruta PI3K/Akt/mTOR.....</b>             | <b>55</b> |
| <b>3. IMM, IPM, BKM120 y rapamicina disminuyen la proliferación de<br/>células T estimuladas.....</b>                        | <b>57</b> |
| <b>4. IMM, IPM, BKM120 y rapamicina inducen parada del ciclo celular<br/>pero no apoptosis en células T estimuladas.....</b> | <b>59</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>5. IMM, IPM, BKM120 y rapamicina reducen la secreción de citoquinas de respuesta Th1 y Th2 en células T estimuladas.....</b>                    | <b>63</b> |
| <b>6. IMM, IPM, BKM120 y rapamicina reducen la expresión de marcadores de activación en células T estimuladas.....</b>                             | <b>65</b> |
| <b>7. IMM, IPM, BKM120 y rapamicina inducen tolerancia específica frente a células alogénicas preservando la respuesta frente a patógenos.....</b> | <b>74</b> |
| <b>8. Efecto de IMM e IPM en un modelo murino de EICH aguda.....</b>   | <b>76</b> |
| <b>DISCUSIÓN.....</b>  | <b>81</b> |
| <b>CONCLUSIONES.....</b>   | <b>93</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>   | <b>97</b> |

# **INTRODUCCIÓN**



## 1. TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (aloTPH) representa la única opción terapéutica curativa para numerosos pacientes con hemopatías malignas y no malignas, así como para algunos tumores sólidos y alteraciones del sistema inmunitario [1].

Anualmente se realizan más de 20.000 aloTPH en todo el mundo [2], principalmente para el tratamiento de hemopatías malignas [3]. En estos casos, el aloTPH se basa en la sustitución total del sistema hematopoyético defectuoso del paciente por otro sano, procedente de un donante que presenta el mayor grado de histocompatibilidad posible. Previo a la infusión de los progenitores hematopoyéticos sanos, se requiere un periodo de preparación conocido como *régimen de acondicionamiento*, que consiste en la administración de altas dosis de quimioterapia y/o radioterapia con el fin de eliminar las células tumorales del paciente [4]. Este tratamiento permite, además, crear espacio en la médula ósea para que los progenitores puedan anidar y, a su vez, conseguir una inmunosupresión del receptor para evitar el rechazo del injerto. Por otra parte, el trasplante de progenitores hematopoyéticos implica la infusión de células inmunocompetentes como células T, que desempeñan un papel fundamental en el aloTPH. La disparidad genética entre donante y receptor da lugar a reacciones inmunológicas, por las que los linfocitos T del donante facilitan los siguientes procesos:

- el implante de los progenitores del donante, al actuar frente a células T residuales del receptor con especificidad anti-donante (anti-injerto)
- el *efecto injerto contra tumor (EICT)* o *contra leucemia (EICL)*, que consiste en el reconocimiento y eliminación de las células neoplásicas residuales del paciente.

Desafortunadamente, estos efectos beneficiosos están íntimamente asociados al desarrollo de la principal complicación del aloTPH, la ***enfermedad injerto contra huésped (EICH)***.

## 2. ENFERMEDAD INJERTO CONTRA HUÉSPED Y CÉLULAS T.

La EICH constituye la complicación más frecuente y grave del aloTPH ejerciendo un impacto significativo en la supervivencia y calidad de vida de estos pacientes. La EICH tiene una etiología compleja, pero su desarrollo se debe principalmente a la

activación de las células T del donante tras reconocer como extrañas las células del receptor, provocando la destrucción de órganos y tejidos sanos del paciente.

## 2.1 EICH aguda y EICH crónica: fisiopatología y manifestaciones clínicas.

La EICH se ha clasificado tradicionalmente en dos tipos según el momento de aparición de los síntomas: **EICH aguda (EICHa)** y **EICH crónica (EICHc)**. La primera es aquella que ocurre en la fase precoz postrasplante, clásicamente durante los primeros 100 días, mientras que la EICHc se desarrolla de forma más tardía (a partir del día +100). Sin embargo, esta distinción temporal es, en cierto modo, arbitraria y actualmente, para establecer un buen diagnóstico se emplea la clasificación propuesta por Filipovich y col. que se centra en las manifestaciones clínicas, que difieren entre una y otra [5].

### 2.1.1 EICH aguda:

La EICHa afecta aproximadamente al 40 – 60% de los individuos sometidos a un aloTPH [6] y se acompaña de un alto riesgo de mortalidad. La EICHa se presenta generalmente como un proceso inflamatorio desencadenado por diversos factores: la enfermedad de base, posibles infecciones y, principalmente, el daño tisular ocasionado por el régimen de acondicionamiento. Esta agresión provoca la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (tormenta o cascada de citoquinas) como el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ), moléculas procedentes de la flora intestinal dañada y otras señales de daño tisular que promueven la activación de las células T del donante frente a las células del receptor. Se estimulan así *linfocitos T alorreactivos* que proliferan, se diferencian a células efectoras y de memoria y, junto con otras células citotóxicas como las células NK (Natural Killer), causan la destrucción tisular. Los principales órganos diana de la EICHa son:

- **piel**, con la aparición de erupciones maculopapulares, úlceras y ampollas, además de otras lesiones citotóxicas (infiltración de linfocitos y cuerpos apoptóticos en dermis papilar);
- **tracto gastrointestinal**, el cual se altera gravemente dando lugar a diarreas, náuseas, vómitos, anorexia y dolor abdominal;
- **hígado**, con endotelitis, infiltrado linfocitario en las áreas portales, pericolangitis

y destrucción de los ductos biliares [7].

### **2.1.2 EICH crónica:**

La EICHc afecta a un 30 – 70% de los individuos que han recibido un aloTPH, con una mediana de aparición de 4 a 6 meses postrasplante [8]. Los mecanismos fisiopatológicos de la EICHc, que puede evolucionar desde una EICHa o surgir de novo [7], no están completamente establecidos debido a su complejidad y a la falta de modelos experimentales adecuados [9]. Las manifestaciones clínicas de la EICHc se asemejan a las observadas en enfermedades autoinmunes. La EICHc no precisa de un contexto inflamatorio y de daño tisular como la EICHa, pero sí de alteraciones en los mecanismos de regulación del sistema inmunológico. Así, se ha sugerido que en el desarrollo de la EICHc intervienen tanto células T maduras del donante como células T generadas en el timo a partir de los progenitores hematopoyéticos infundidos, que escapan de los mecanismos de inmunotolerancia [10]. Además de las células T, los linfocitos B del donante desempeñan un importante papel al estimular a los linfocitos T y producir autoanticuerpos y citoquinas estimuladoras [11]. La participación de ambas poblaciones lleva a la inflamación crónica y fibrosis, provocando así un síndrome de tipo escleromatoso.

Las células T son, por tanto, una de las principales poblaciones responsables del desarrollo de ambas formas de EICH.

## **2.2 Células T y alorreconocimiento.**

Los linfocitos T son efectores claves en la respuesta inmunológica adaptativa. Su función es defender al individuo de organismos extraños o células defectuosas, como células infectadas por patógenos y células tumorales. Para ello, han de reconocer antígenos específicos procedentes de estas células u organismos, lo que desencadena una respuesta de eliminación y memoria frente a ellos. Para que se produzca este reconocimiento y activación, los antígenos deben ser presentados a las células T por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, *Major Histocompatibility Complex*), denominado en humanos sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*), expresadas en la membrana de las células que presentan el antígeno.

### 2.2.1 Sistema HLA:

El sistema HLA está formado por un gran número de moléculas ampliamente polimórficas codificadas por una familia de genes ubicados en el cromosoma 6. El sistema HLA se clasifica en tres clases, siendo las clases I y II las responsables de presentar antígenos extraños. Las moléculas HLA clase I (HLA I) se expresan en la superficie de todas las células nucleadas, mientras que las de clase II (HLA II) solo se expresan en células especializadas en el procesamiento y presentación de antígenos, tales como células dendríticas, macrófagos y linfocitos B, denominadas APCs (*Antigen Presenting Cells*). Las células T CD8<sup>+</sup> interactúan con moléculas HLA I mientras que las células T CD4<sup>+</sup> interactúan con moléculas HLA II.

El gran polimorfismo genético de las moléculas HLA determina el grado de compatibilidad entre individuos. La función natural de estas moléculas es presentar péptidos extraños derivados de antígenos proteicos a las células T. Sin embargo, en el contexto del trasplante alogénico, las moléculas HLA ejercen el papel de antígenos extraños, denominados aloantígenos. Las moléculas HLA del receptor pueden activar las células T del donante de dos maneras distintas: directa e indirecta. La presentación directa implica el reconocimiento de las moléculas HLA intactas del receptor por las células T del donante. La presentación indirecta conlleva el procesamiento de las moléculas HLA del receptor y la presentación de péptidos derivados de ellas por las APCs del donante. Debido a la amplia expresión de las moléculas HLA, son muchos los tejidos que inducen respuesta de las células T alogénicas. Así pues, las diferencias polimórficas entre las moléculas HLA de donante y receptor son las principales responsables de desencadenar la EICH. Por esta razón, es importante encontrar un donante con el mayor grado de compatibilidad posible con el receptor, ya que la incidencia de la EICH y la morbi-mortalidad postrasplante están relacionadas con la disparidad HLA [12]. La realización del tipaje HLA ha mejorado la elección del donante, lo que ha conducido a una menor incidencia de EICH grave y mejor supervivencia. Sin embargo, aún en un contexto de identidad HLA completa entre individuos emparentados, existen otros polimorfismos genéticos que pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad: antígenos menores de histocompatibilidad (mHA) [13], citoquinas proinflamatorias [14], genes de receptores tipo inmunoglobulina de las células NK (complejo KIR) [15] o proteínas relacionadas con el sistema inmune innato [16, 17].

En definitiva, tras el aloTPH, las células T del donante, tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, se activan frente a aloantígenos presentes en las células del receptor y, se induce así el desarrollo de la EICH.

### 2.2.2 Células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>:

Las **células T CD8<sup>+</sup>** desempeñan un importante papel en el control de infecciones virales y otros patógenos intracelulares, así como de células tumorales. Por otra parte, también son claves en el aloTPH al eliminar células tumorales residuales (EICL), pero al mismo tiempo destruyen células sanas (EICH) del receptor. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> efectores son principalmente citotóxicos y destruyen células diana (células infectadas, tumorales o alogénicas) mediante mecanismos citotóxicos como la vía Fas/Fas ligando, la vía perforina/granzima y la acción de citoquinas proinflamatorias como INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  sobre la célula. Estos mecanismos, que inducen apoptosis por activación de caspasas y proteínas pro-apoptóticas [18], son importantes en el desarrollo de la EICH [19-21].

Las **células T CD4<sup>+</sup>** se dividen en varias subpoblaciones efectoras, siendo las más conocidas las células T colaboradoras o *helper* (Th) Th1, Th2 y Th17. Otra de las subpoblaciones que se ha caracterizado ampliamente en los últimos años son las células T reguladoras naturales CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (Treg) [22].

La función principal de los linfocitos Th1 es potenciar la actividad fagocítica de los macrófagos y la actividad citotóxica de células NK y linfocitos T CD8<sup>+</sup> frente a células diana (tumorales o infectadas). Las células Th2 favorecen la proliferación y la producción de anticuerpos por parte de las células B, así como la actividad de eosinófilos y mastocitos, por lo que median la respuesta humoral frente a patógenos extracelulares y participan en enfermedades alérgicas. Las células Th17 intervienen en la respuesta inmune frente a bacterias y hongos, reclutando neutrófilos y macrófagos en los tejidos infectados y contribuyen al desarrollo de algunas enfermedades autoinmunes [23].

Por el contrario, las células Treg ejercen un papel fundamental en la tolerancia inmunológica frente a lo propio y en la homeostasis inmunitaria.

Cada una de estas subpoblaciones secreta un patrón de citoquinas característico, que determina su papel en la respuesta inmune. Así, las células Th1 se caracterizan por expresar interleucina 2 (IL-2), INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  [22]; las células Th2, por producir citoquinas como IL-4, IL-5 e IL-13 y las células Th17, por secretar IL-17, IL-6, IL-21, IL-23 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) [22]. Con respecto a las células Treg, éstas se caracterizan por expresar el represor transcripcional FOXP3 (*forkhead box P3*) y las citoquinas IL-10, IL-35 y TGF- $\beta$  [22, 24].

Se ha demostrado que las subpoblaciones Th1, Th2 y Th17 del donante están

implicadas en la evolución de la EICH, tanto aguda como crónica [22, 25-28]. Respecto a las células Treg, una mayor proporción se ha vinculado a menor severidad de la EICH [29-31].

### **2.3 Estrategias de profilaxis de EICH.**

Hasta la fecha, los regímenes convencionales empleados para prevenir el desarrollo de EICH han consistido en la combinación del antagonista del ácido fólico metotrexato (MTX) con un inhibidor de calcineurina, como ciclosporina A (CsA) o tacrolimus (TAC) (MTX/CsA o MTX/TAC). Estos agentes reducen la proliferación y función de los linfocitos T al inhibir la enzima dihidrofolato reductasa (el MTX) y bloquear la vía  $Ca^{2+}$ /Calcineurina/NFAT (los inhibidores de calcineurina). Sin embargo, a pesar de que la administración de estos tratamientos ha reducido la severidad de la EICH e incrementado la supervivencia de los pacientes [32, 33], la incidencia de la enfermedad y la mortalidad asociada a ella continúan siendo elevadas. Además, son numerosos los efectos secundarios asociados a estos regímenes como nefrotoxicidad, neurotoxicidad o mucositis [34, 35]. Por todo ello, se han seguido evaluando nuevas estrategias para prevenir la activación de las células T frente a los tejidos del receptor y, por tanto, el desarrollo de la EICH. Así, se ha evaluado la eficacia de la depleción de linfocitos T del donante, tanto *ex vivo* como *in vivo*, administrando al paciente anti-CD52 (alantuzumab) [36] o globulina antitimocítica (ATG) [37], que inducen la lisis de células T. Estas estrategias reducen eficazmente la incidencia de EICH, pero no incrementan la supervivencia, debido al aumento de infecciones graves, recaídas, fallo del implante y síndromes proliferativos asociados a infección por Virus Epstein-Barr [1]. Esto condiciona que continúe habiendo una activa investigación analizando el efecto de nuevos fármacos y combinaciones sobre la activación de células del sistema inmune implicadas en el desarrollo de EICH, especialmente sobre linfocitos T [38-42].

### 3. ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T.

La célula T virgen o naïve es aquella célula T madura que no ha establecido contacto previo con el antígeno. La activación comienza cuando el receptor de la célula T (TCR) interacciona de manera específica con un complejo antígeno-HLA. Para que la célula T se active de manera adecuada, esta primera señal iniciada por el TCR (**señal 1**) requiere otras dos señales:

- **señal 2**, proporcionada por moléculas coestimuladoras como CD28, CD2, CD5, CD30, 4-1BB (CD134), ICOS, etc.

- **señal 3**, proporcionada por las citoquinas del microambiente (IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6...).

Estas señales dan lugar a la activación de distintas rutas de señalización, como la vía dependiente de  $Ca^{2+}$  ( $Ca^{2+}$ /Calmodulina), la ruta de las MAP-quinasas (Ras/Raf/MEK/ERK), la ruta PI3K/Akt/mTOR o la vía JAK/STAT, que convergen en la activación de diversos factores de transcripción, como NF- $\kappa$ B, NFAT, AP-1 o STAT. Estos factores de transcripción activan la expresión de genes relacionados con la expansión clonal y la diferenciación hacia célula T efectora o de memoria (figura 1). Respecto a la proliferación, promueven la síntesis de IL-2 y de la cadena alfa de su receptor (IL-2R $\alpha$ , CD25) [43], permitiendo la formación de un receptor que une IL-2 con alta afinidad, lo cual favorece la entrada en el ciclo celular y la progresión del mismo [44].

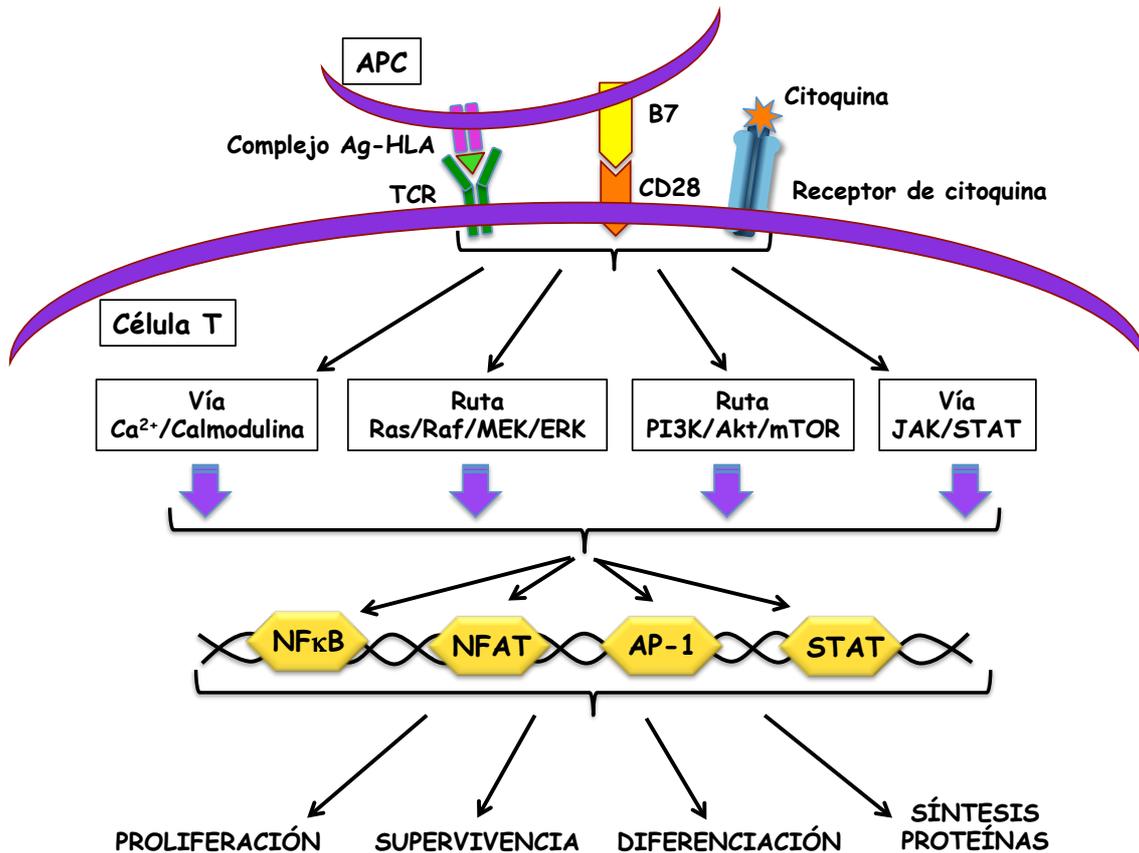


Figura 1. Activación y vías de señalización en linfocitos T.

Tras la expansión y actuación de las células efectoras, tiene lugar la fase de contracción, durante la cual la mayoría de estas células mueren por apoptosis y solo unas pocas células T antígeno-específicas sobreviven como células T de memoria [45]. Estas células, de vida media larga, se caracterizan por su capacidad para responder de manera más rápida y efectiva al reconocimiento del antígeno del que son específicas. Dentro de las células T de memoria se distinguen dos poblaciones: **células T de memoria efectora** ( $T_{ME}$ ) y **células T de memoria central** ( $T_{MC}$ ). Las células  $T_{ME}$ , con cierto carácter efector, circulan a través de tejidos no linfoides y actúan rápidamente ante una re-estimulación con el mismo antígeno. Las  $T_{MC}$ , localizadas principalmente en tejidos linfoides secundarios y médula ósea, se mantienen durante más tiempo en un estado menos diferenciado y, ante una re-estimulación, generan un gran número de células efectoras de forma más rápida que durante la primera estimulación, proporcionando así una respuesta fuerte y eficaz [45].

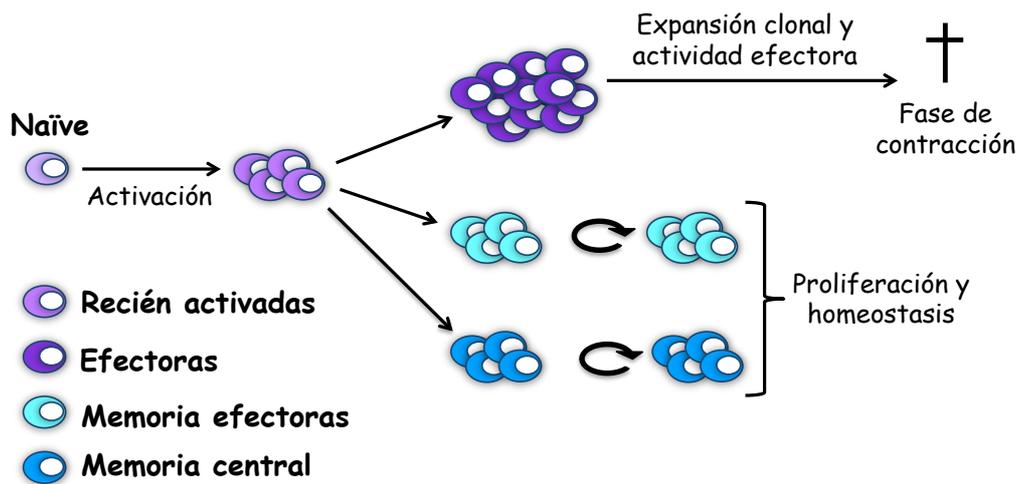


Figura 2. Activación de células T naïve, proliferación y diferenciación hacia células efectoras y de memoria.

Una de las principales vías de activación de la célula T, que regula todos estos procesos, es la ruta PI3K/Akt/mTOR [46-48].

#### 4. RUTA PI3K/AKT/mTOR.

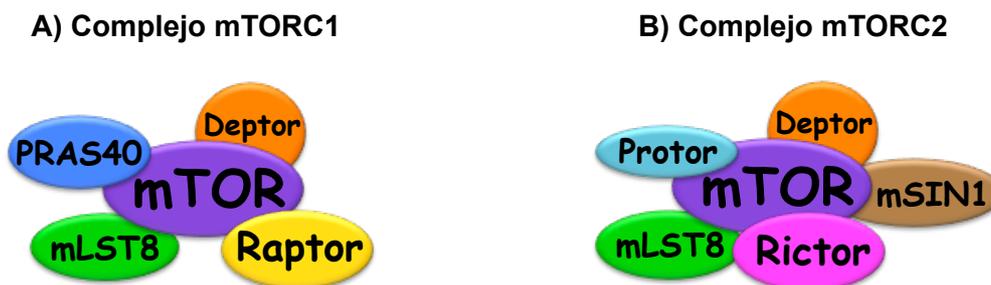
En células eucariotas, la vía PI3K/Akt/mTOR regula numerosos procesos celulares como supervivencia, metabolismo, crecimiento, proliferación y diferenciación celular en respuesta a diversos estímulos [49].

La activación de las enzimas **fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K)** de clase I se dispara cuando, a través de su subunidad reguladora, interacciona con receptores tirosina quinasa (RTK, *receptor tyrosine kinase*) o receptores acoplados a proteína G, tras la unión de éstos con sus ligandos. Una vez activada, PI3K induce la formación de fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PIP3) a partir de fosfatidilinositol en la cara interna de la membrana citoplasmática [50]. Esto favorece que proteínas como Akt y PDK1 (*3-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1*), se desplacen del citoplasma a la membrana y se unan al PIP3. Esta unión induce la activación de PDK1, que fosforila a la quinasa Akt en su residuo T308 [51].

**Akt** regula la actividad de numerosos efectores como factores de transcripción (FoxO, NF-κB), proteínas pro- y anti-apoptóticas (BAD, BIM, Fas ligando...) o proteínas que modulan la progresión del ciclo celular (ciclinas D y E, *c-jun*, *c-myc*

p27<sup>KIP1</sup>, p21<sup>Cip1/WAF1</sup>), induciendo así supervivencia y proliferación [52] (figura 4).

Una de las principales dianas de Akt es la serina/treonina quinasa **mTOR** (*mammalian target of rapamycin*). Esta quinasa, altamente conservada en eucariotas, es clave en la regulación de procesos celulares como síntesis de proteínas, crecimiento, proliferación, diferenciación y metabolismo celular [53]. mTOR puede formar dos complejos funcionales, **mTORC1** y **mTORC2** (*mTOR Complex 1* y *mTOR Complex 2*), que difieren en las proteínas con las que se asocia mTOR (figura 3), en las moléculas que regulan su actividad y en los sustratos que modulan.



**Figura 3. Complejos mTORC1 y mTORC2:** **A)** Complejo mTORC1 constituido por mTOR, Raptor (*protein regulatory-associated protein of mTOR*), mLST8 (*mammalian lethal with Sec13 protein 8*), PRAS40 (*proline-rich Akt substrate 40 kDa*) y Deptor (*DEP-domain-containing mTOR-interacting protein*). **B)** Complejo mTORC2 formado por mTOR, mLST8, Deptor, Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*), mSIN1 (*mammalian stress-activated protein kinase (SAPK) interacting protein 1*) y Protor (*protein observed with rictor*).

Akt activa el complejo mTORC1, mediante la inhibición de sus represores TSC2 (*Tuberous Sclerosis Complex 2*) y PRAS40 [54, 55]. Una vez activado, mTORC1 regula el crecimiento celular modulando la transcripción y síntesis de proteínas. Los dos sustratos mejor estudiados de mTORC1, claves en la traducción, son **4E-BP1** (*Eukaryotic Initiator Factor 4E (eIF4E) Binding Protein 1*) y p70S6K (*70kDa ribosomal protein S6 kinase*) [56, 57]. En la célula en reposo, 4E-BP1 está hipofosforilado y unido al factor de iniciación de la traducción eIF4E. La fosforilación de 4E-BP1 por mTORC1 permite la liberación de eIF4E [56] para formar el complejo eIF4F e iniciar la síntesis de proteínas dependiente de cap. Por otra parte, **p70S6K** y su dianas, como **rpS6** (*ribosomal protein S6*), están implicadas en la iniciación de la traducción y la elongación [58-60]. Muchas de las proteínas inducidas por mTORC1 están asociadas con la supervivencia y la proliferación celular [61-64] (figura 4).

Respecto a la activación de mTORC2, no están claras cuales son las vías o moléculas que regulan dicha activación, aunque diversos autores afirman que se activa por la vía de PI3K [65-67]. Una vez activado, el complejo mTORC2 fosforila la quinasa Akt en el residuo S473 [65]. Aunque la fosforilación de Akt en T308 parece suficiente para que la quinasa ejerza su acción sobre determinados sustratos, como TSC2 [68], la enzima necesita ser fosforilada en S473 para alcanzar su máxima actividad [69]. Otros efectores del complejo mTORC2 son PKC (*protein kinase C*) y SGK (*Serum- and Glucocorticoid-induced protein Kinase*), los cuales comparten sustratos comunes con Akt, como los factores de transcripción NFκB y FoxO [70], que regulan la supervivencia y la progresión del ciclo celular (figura 4).

Así pues, ambos complejos mTORC participan en procesos de supervivencia, crecimiento y proliferación celular.

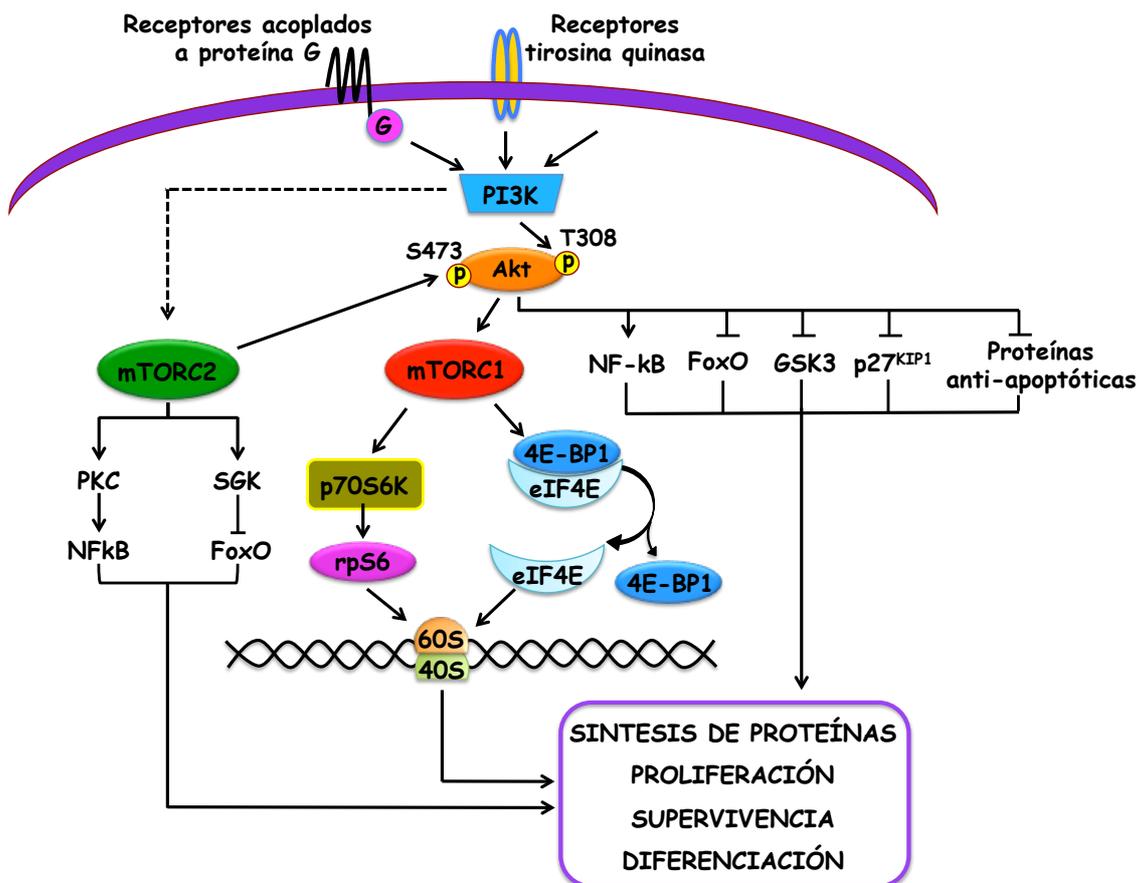


Figura 4. Ruta de señalización PI3K/Akt/mTOR.

Por otra parte, se han descrito diversos mecanismos de retroalimentación negativa que regulan la actividad de la vía PI3K/Akt/mTOR. Por ejemplo, mTORC1 y p70S6K pueden inhibir la señalización a través de PI3K [71-73]. Por otra parte, p70S6K fosforila directamente mTORC2, disminuyendo su capacidad de fosforilar Akt S473 [74, 75] (figura 5).

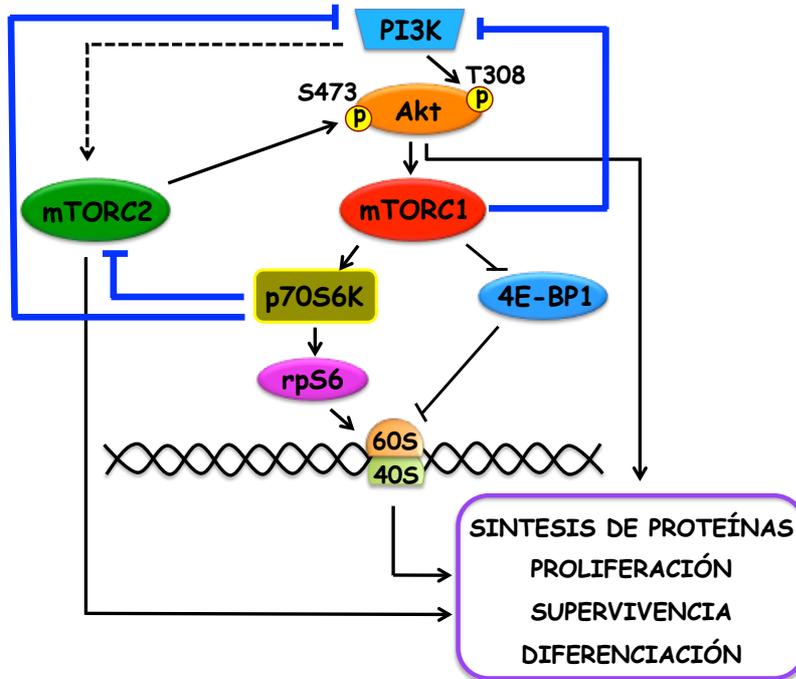


Figura 5. Feedback negativos en la ruta PI3K/Akt/mTOR.

### Ruta PI3K/Akt/mTOR en linfocitos T.

Con respecto a los linfocitos T, se ha descrito que las señales proporcionadas por el TCR, CD28 o receptores de citoquinas inducen la señalización de la vía PI3K/Akt/mTOR [48], promoviendo la activación de la célula T. Por el contrario, se ha descrito que la inhibición de esta ruta da lugar a la inducción de anergia o falta de respuesta tras una re-estimulación posterior con el antígeno [76-78].

Diversos estudios han evaluado el papel de la ruta PI3K/Akt/mTOR en la activación de las células T, habiéndose demostrado su importancia en la inducción de supervivencia, proliferación y diferenciación celular:

#### a) Supervivencia:

La activación de la vía PI3K/Akt/mTOR a través del TCR, CD28 o citoquinas como IL-2, IL-7 e IL-15 modula los niveles de proteínas pro- y anti-apoptóticas, promoviendo la supervivencia celular [64, 79, 80].

**b) Proliferación:**

Tras la estimulación de la célula T a través del TCR, CD28 e IL-2 la ruta PI3K/Akt/mTOR induce la entrada y progresión del ciclo celular [81], al regular la actividad de proteínas como ciclinas, CDKs (*ciclin dependent kinase*) o el inhibidor de CDKs p27<sup>KIP1</sup> [44, 82-86].

**c) Diferenciación celular:**

En los últimos años, diversos estudios han destacado el papel de mTOR en la diferenciación de las células T, tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>.

En cuanto a las células T CD4<sup>+</sup>, se ha descrito que la activación de mTOR bloquea la diferenciación hacia Treg [86-88], mientras que la inhibición de mTOR con rapamicina induce su generación/expansión [89-91].

Además, PI3K/Akt/mTOR ejerce un papel fundamental en la diferenciación de las células T CD4<sup>+</sup> efectoras [46] (figura 6). En función de las citoquinas presentes durante la activación, mTOR regula la expresión de factores de transcripción y citoquinas que determinarán el linaje de la célula T CD4<sup>+</sup> [22] como T-bet e IFN- $\gamma$  (diferenciación hacia Th1), GATA-3 e IL-4 (Th2) o ROR $\gamma$ t e IL-17 (Th17) [86-88]. Más concretamente, se ha demostrado que mTORC1 es crucial para la diferenciación a linajes Th1 y Th17 [86], mientras que mTORC2 es imprescindible para la diferenciación Th1 y Th2 [88], pero dispensable para la diferenciación a Th17 [86, 88].

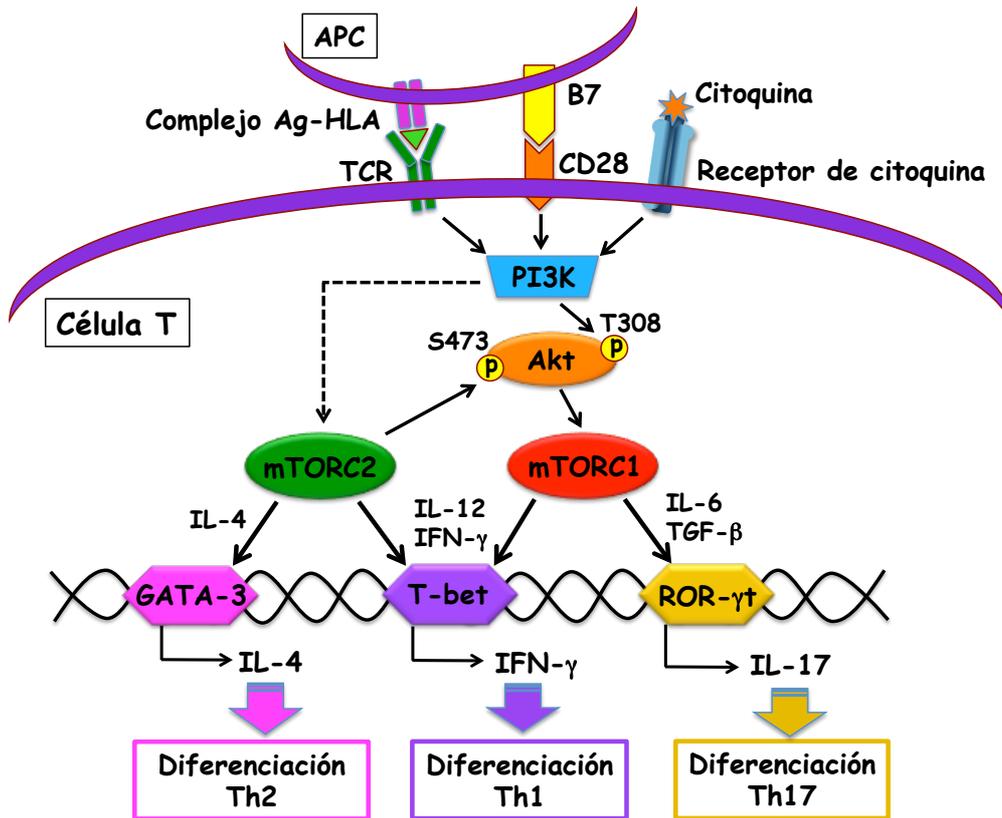


Figura 6. Diferenciación de las células T CD4<sup>+</sup> a través de la ruta PI3K/Akt/mTOR.

Por otra parte, se ha demostrado que mTOR es clave en la regulación de la diferenciación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> hacia células efectoras o de memoria [92-97], pues regula la expresión de dos factores de transcripción claves: T-bet y eomesodermina (EOMES) [95, 98]. Ambos factores cooperan en el proceso de diferenciación, aunque sus niveles relativos determinan si las células se dirigen hacia T efectoras/T<sub>ME</sub> o hacia T<sub>MC</sub> [99] (figura 7). Además, diversos estudios en modelos animales de infección vírica o inmunización con vacunas han demostrado que la inhibición de mTOR favorece la generación de células T CD8<sup>+</sup> de memoria [92, 96].

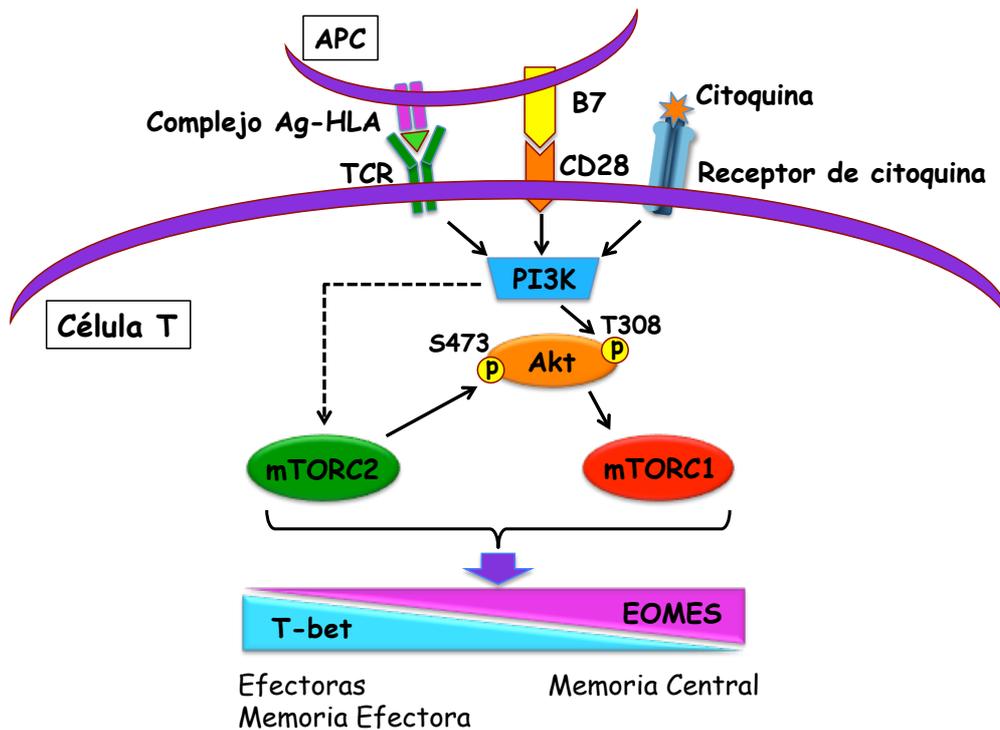


Figura 7. Diferenciación de las células T CD8<sup>+</sup>.

En definitiva, todos estos estudios sugieren que el destino de las células T queda determinado por una fina regulación de la ruta PI3K/Akt/mTOR.

## 5. INHIBIDORES DE LA RUTA PI3K/Akt/mTOR.

Diversas enfermedades, tanto tumorales como metabólicas, cardiovasculares, neurológicas o autoinmunes, están asociadas a alteraciones en la ruta PI3K/Akt/mTOR [49]. Por ello, en los últimos años se han desarrollado numerosos fármacos que actúan sobre distintos componentes de la vía, con el fin de inhibir la activación constitutiva de la ruta PI3K/Akt/mTOR en estas patologías.

### 5.1 Rapamicina.

La rapamicina, también conocido como Sirolimus o Rapamune (Whyeth Pharma), fue aislada y caracterizada a partir de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* [100, 101]. Es una lactona macrocíclica lipofílica con un peso molecular de 914,2 g/mol y cuya fórmula química es C<sub>51</sub>H<sub>79</sub>NO<sub>13</sub>. En mamíferos, rapamicina se une con la inmunofilina FKBP12 (12-kDa FK506-Binding Protein) para formar el complejo

FKBP12/rapamicina, que interacciona con mTOR cuando forma parte del complejo mTORC1, inhibiendo así su actividad quinasa. Con respecto al complejo mTORC2, éste solía definirse como complejo insensible a rapamicina. Sin embargo, se ha comprobado que en determinadas células, sometidas a un tratamiento prolongado o con altas dosis, rapamicina puede inhibir la actividad de mTORC2, probablemente porque se une a moléculas de mTOR recién sintetizadas, impidiendo su interacción con rictor y la formación de nuevos complejos mTORC2 [102].

Debido a su capacidad de inhibir mTOR, rapamicina tiene actividad inmunosupresora y antitumoral.

### **5.1.1 Actividad inmunosupresora:**

El uso de rapamicina está aprobado para prevenir el rechazo del trasplante renal [103] y, en los últimos años, diversos ensayos clínicos han valorado su utilidad en el control de la EICH [104]. Rapamicina modula la respuesta inmune al reducir la proliferación, diferenciación y actividad de células dendríticas, NKs, neutrófilos, mastocitos, linfocitos B y linfocitos T [105], siendo esta última población sobre la que más se ha evaluado su papel inmunosupresor. Así, se ha comprobado que rapamicina induce anergia en células T estimuladas [76, 78] y bloquea la progresión del ciclo celular [44, 84, 85]. Además, rapamicina interfiere en el proceso de diferenciación tanto de células T CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>. En células T CD4<sup>+</sup> estimuladas, rapamicina disminuye la secreción de citoquinas como IFN- $\gamma$  e IL-17, dificultando la generación de células Th1 y Th17, respectivamente, [86, 106, 107] y promueve la generación de células Treg [89, 91, 108]. Así mismo, se ha demostrado que la administración de rapamicina en modelos animales de infección vírica o vacunación fomenta la generación de células T CD8<sup>+</sup> de memoria [92, 95, 96, 98].

En cuanto al uso de rapamicina en el contexto de la EICH, se han obtenido resultados prometedores al administrar la combinación rapamicina/TAC o rapamicina/MMF/ATG en la profilaxis de EICH aguda [109-113]. La rapamicina también se ha utilizado con buenos resultados en el tratamiento de EICH aguda refractaria a esteroides [114, 115] o como tratamiento de primera línea [116]. Debido a su capacidad de inducir la generación de células Treg y a su efecto antifibrótico, se ha utilizado también en el tratamiento de EICH crónica [117-119].

### 5.1.2 Actividad antitumoral:

Numerosos tumores tienen desregulada la vía PI3K/Akt/mTOR, por lo que rapamicina y sus derivados, como temsirolimus (CCI-779) y everolimus (RAD001), se han utilizado en el tratamiento de diversas neoplasias [120-122]. Sin embargo, su eficacia ha sido modesta frente a algunos tipos de cáncer [123, 124], posiblemente porque rapamicina y sus análogos bloquean de forma incompleta la ruta PI3K/Akt/mTOR como se ha descrito previamente [71, 74, 75, 125-129].

Con el objetivo de mejorar su efecto antitumoral, se han desarrollado nuevos inhibidores de la vía PI3K/Akt/mTOR.

## 5.2 Inhibidor de mTORC1 y mTORC2.

El inhibidor de mTORC1/mTORC2 (IMM) es un compuesto sintético perteneciente al grupo de inhibidores de mTOR de la serie imidazo[4,5-b]pirazin-2-onas. Se une de forma reversible al sitio de unión del ATP de la proteína mTOR, impidiendo la incorporación del ATP y, por tanto, la actividad quinasa tanto de mTORC1 como de mTORC2.

Se ha demostrado en estudios *in vitro* que IMM posee actividad antineoplásica, confirmando que inhibe selectiva y eficazmente la quinasa mTOR en células tumorales. Además, reduce la fosforilación de Akt-S473, rpS6 y 4EB-P1 y, por tanto, la traducción dependiente de cap. Así pues, inhibe la señalización de 4EB-P1 y mTORC2 resistentes a rapamicina. Por otra parte, IMM induce parada del ciclo celular en fase G1 y apoptosis en células plasmáticas de mieloma, incrementando la activación de caspasa 3.

Su acción antitumoral se ha confirmado en modelos animales de cáncer humano, donde su administración oral ha sido bien tolerada.

## 5.3 NVP-BKM120.

NVP-BKM120 (BKM120, Novartis Pharma), también conocido como Buparlisib, es un compuesto sintético derivado de la 2-morfolino pirimidina [130]. De nombre químico 5-(2,6-dimorfolinopirimidin-4-il)-4-(trifluorometil) piridin-2-amina y fórmula  $C_{18}H_{21}F_3N_6O_2$ , tiene un peso molecular de 410,39 g/mol. BKM120 es un inhibidor de PI3K pan-clase I, pues inhibe de forma reversible y eficaz las cuatro isoformas de la subunidad catalítica de PI3K clase I ( $p110\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) por competición con el ATP.

BKM120 ha mostrado actividad antineoplásica frente a células tumorales con alteraciones en la ruta PI3K [131-142], en las que inhibe la fosforilación de Akt en T308 y S473 [130, 131, 133] y su actividad quinasa [130, 132]. Además, reduce la actividad de mTOR [130] y la fosforilación de sus dianas p70S6K, prS6 y 4E-BP1 [135, 138]. Así mismo, induce parada del ciclo celular y apoptosis mediada por caspasas [131, 133, 135, 137, 138]. En cambio, se ha comprobado que no induce apoptosis en progenitores de médula ósea ni en células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos [131].

En modelos murinos de cáncer se ha confirmado que el tratamiento oral con BKM120 es bien tolerado, aumenta la supervivencia e inhibe el crecimiento tumoral [130, 131, 133, 134, 138]. La seguridad de BKM120 se ha confirmado en diversos ensayos clínicos [140-142].

#### **5.4 Inhibidor de PI3K/mTOR.**

El inhibidor de PI3K/mTOR (IPM) es un compuesto sintético derivado de las imidazoquinolinas. IPM es un inhibidor competitivo de ATP, que actúa de manera selectiva y reversible sobre todas las isoformas de PI3K clase I y sobre mTOR, tanto mTORC1 como mTORC2.

IPM ejerce una potente actividad antineoplásica sobre una amplia variedad de líneas tumorales que tienen constitutivamente activada la vía PI3K/Akt/mTOR.

Se ha comprobado en estudios *in vitro* que IPM inhibe la fosforilación de Akt en los residuos T308 y S473, así como su actividad quinasa. Por otra parte, IPM reduce la fosforilación de 4EB-P1, p70S6K y rpS6 y, por tanto, la traducción dependiente de cap y la síntesis de proteínas vinculadas con la supervivencia y el ciclo celular. Además, en algunas células tumorales IPM incrementa la expresión de proteínas proapoptóticas y la activación de caspasas. Sin embargo, se ha comprobado que IPM no afecta a la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos.

La actividad antitumoral de IPM se ha comprobado en modelos murinos de cáncer humano, en los que el compuesto, administrado oralmente, es bien tolerado, aumenta la supervivencia e inhibe el crecimiento tumoral.

Actualmente, se está evaluando en ensayos clínicos fase I/II la eficacia de IPM, solo o en combinación con otros fármacos.

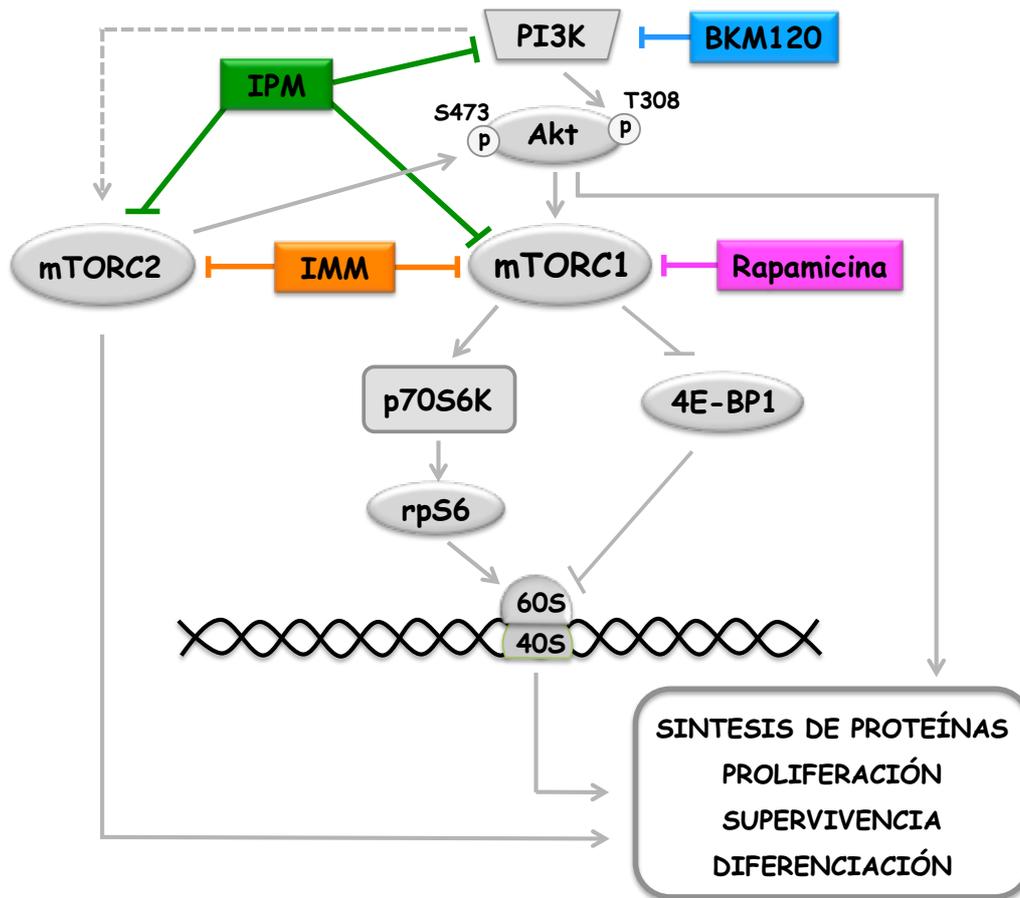


Figura 8. Inhibidores de la ruta PI3K/Akt/mTOR.



**HIPÓTESIS**



La EICH constituye la principal causa de morbi-mortalidad en los pacientes que reciben un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Los linfocitos T del donante, que se activan frente a las células del receptor, son los principales efectores celulares implicados en el desarrollo de la EICH. Una de las rutas de señalización claves en la activación de las células T es la ruta PI3K/Akt/mTOR. Por ello, el uso de fármacos que bloqueen dicha ruta podría resultar eficaz para inhibir el desarrollo de la enfermedad. El inhibidor de mTORC1 rapamicina ha proporcionado resultados prometedores en la profilaxis de la EICH, aunque a pesar de su administración la incidencia de la enfermedad sigue siendo elevada.

Nuestra hipótesis es que la limitada efectividad clínica de rapamicina se debe a que ejerce un bloqueo incompleto de la ruta PI3K/Akt/mTOR. Por lo que, fármacos que bloqueen la vía de manera más efectiva inhibirían más eficazmente la activación de los linfocitos T alorreactivos y, por tanto, el desarrollo de la EICH.



## **OBJETIVOS**



## **Objetivo general:**

Analizar el efecto del inhibidor de mTORC1/mTORC2 IMM y del inhibidor de PI3K/mTORC1/mTORC2 IPM sobre células T y evaluar su posible aplicación en la profilaxis de la enfermedad injerto contra huésped. A su vez, contrastar la actividad de ambos compuestos con la de un fármaco que actúa a nivel de mTORC1 (rapamicina) y otro que inhibe PI3K (BKM120).

## **Objetivos específicos:**

1. Estudiar y comparar el efecto de IMM, IPM, rapamicina y BKM120, sobre la activación, proliferación y supervivencia de células T humanas *in vitro*.

2. Evaluar si la administración de IMM, IPM, rapamicina y BKM120 durante la estimulación alogénica de células T *in vitro* genera tolerancia específica de las células T alorreactivas, preservando la inmunidad frente a patógenos.

3. Evaluar, en un modelo *in vivo*, la eficacia de IMM e IPM, en comparación con rapamicina, en la inhibición de la EICH tras el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. MATERIAL.

### 1.1 Estudios *in vitro*.

#### 1.1.1 Células:

Las células primarias humanas empleadas en la mayoría de los estudios *in vitro* se obtuvieron a partir de concentrados leuco-plaquetarios (*buffy-coat*) de sangre periférica de donantes sanos, extraídos en sistema de bolsa LQT6284LS (Macopharma) y procedentes del Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León (CHEMCYL). Para realizar la técnica ELISpot INF- $\gamma$  se obtuvieron, en tubos de heparina, muestras de sangre periférica de donantes sanos, algunos de ellos citomegalovirus (CMV) seropositivos (IgG<sup>+</sup> IgM<sup>-</sup>). Todas las muestras se obtuvieron tras el correspondiente consentimiento informado de acuerdo con la Declaración de Helsinki y se emplearon según las normas establecidas por el Comité Ético del Hospital Universitario de Salamanca. Su manipulación se realizó en el Laboratorio de Cultivos y Terapia Celular del Hospital Universitario de Salamanca, en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar.

#### 1.1.2 Fármacos y disolventes:

En los estudios *in vitro* se utilizaron los siguientes fármacos:

- Inhibidor de PI3K/mTOR (IPM).
- Inhibidor de mTORC1/mTORC2 (IMM).
- BKM120 (Selleck Chemicals, Munich, Alemania).
- Rapamicina (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, Estados Unidos).

Como disolvente para la preparación de los fármacos se empleó dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).

## 1.2 Estudios *in vivo*.

### 1.2.1 Animales:

Se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c y ratones macho de la cepa C57BL/6 de 12 semanas de edad (Laboratorios Harlan, Carshalton, UK).

Los animales fueron estabulados en jaulas estériles con cobertor, en aisladores de aire filtrado y presión positiva en el Animalario del Edificio Departamental de la Universidad de Salamanca. La manipulación de los ratones se realizó de acuerdo con las normas establecidas por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

### 1.2.2 Fármacos y disolventes:

En los estudios *in vivo* se emplearon los siguientes fármacos y disolventes:

- Inhibidor de PI3K/mTOR (IPM).
- Inhibidor de mTORC1/mTORC2 (IMM).
- Rapamicina (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, Estados Unidos).
- 1-metil-2-pirrolidona (NMP) (Sigma-Aldrich Corp.).
- Polietilenglicol 300 (PEG300) (Sigma-Aldrich Corp).
- Carboximetilcelulosa (CMC) (Sigma-Aldrich Corp.,).
- Tween 80 (Sigma-Aldrich Corp).
- Etanol 100% (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania).

## 2. Métodos.

### 2.1 Estudios *in vitro*.

#### 2.1.1 Aislamiento y cultivo de células mononucleares y linfocitos T:

Las muestras de *buffy-coats* se diluyeron 1/8 y las de sangre periférica 1/2 en suero fisiológico (Bartex S.L., Valencia, España). A partir de ambos tipos de muestras se obtuvo la interfase de células mononucleares (CMNs) mediante centrifugación (1.600 rpm durante 30 minutos) en gradiente de densidad con Ficoll-Paque™ PLUS (densidad máxima: 1.078 g/ml) (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia).

Las CMNs se recogieron y lavaron 2 veces a 1.200 rpm durante 10 minutos con tampón salino Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) 1X (GIBCO Life Technologies, Paisely, Reino Unido). Tras el segundo lavado, las células fueron resuspendidas en medio de cultivo completo constituido por medio RPMI 1640, penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml (todos ellos de GIBCO Life Technologies) y suplementado con 10% de suero humano AB (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, Estados Unidos). A continuación, se procedió al recuento celular con azul tripán en cámara de Neubauer.

A partir de la fracción mononuclear se utilizaron:

a) CMNs, para los estudios de proliferación, fenotipo y marcadores de activación de linfocitos T.

b) CMNs enriquecidas en células T mediante eliminación de monocitos por adherencia al plástico, para los estudios mediante western blot. Las CMNs fueron cultivadas a una concentración de  $3 \times 10^6$  células/ml en RPMI 1640 suplementado con 2% de suero humano AB, penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml, en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (Corning Incorporated, NY, Estados Unidos). El cultivo se mantuvo en estufa durante toda la noche y al día siguiente se recogieron las células no adheridas, se lavaron a 1.200 rpm durante 10 minutos y se procedió al recuento de células viables con azul tripán en cámara de Neubauer.

c) Células T, aisladas a partir de CMNs mediante selección inmunomagnética. Para los estudios de ciclo celular, apoptosis y secreción de citoquinas, se aislaron linfocitos T, mediante depleción inmunomagnética de células no T, en el separador AutoMACS® Pro Separator (AutoMACS; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) utilizando el kit "Pan T Cell Isolation Kit II" (Miltenyi) según las instrucciones del fabricante. Las células obtenidas se lavaron a 1.200 rpm durante 10 minutos, se resuspendieron en medio completo y se cuantificaron en cámara de Neubauer. Se evaluó la proporción de células T aisladas y viables mediante citometría de flujo. Para ello, se tomó una pequeña muestra que fue lavada con PBS a 2.000 rpm durante 5 minutos y, posteriormente, incubada 15 minutos en oscuridad con un anticuerpo monoclonal (AcMo) CD3-APC (tabla 1). Tras lavar el exceso de anticuerpo con PBS a 2.000 rpm durante 5 minutos, la muestra fue marcada con el marcador de muerte celular 7- aminoactinomicina D (7-AAD) (BD Pharmingen™, San Jose, CA, Estados Unidos) y fue adquirida en el citómetro FACSCalibur con el soporte informático CellQuest® (ambos de BD Bioscience, San Jose, CA, Estados Unidos). La pureza de la muestra, que fue siempre > 95%, se determinó con el programa Infinicyt™ versión 1.7 (Cytognos S.L., Salamanca, España).

| Antígeno | Clon | Especie | Isotipo          | Fluorocromo | Proveedor     |
|----------|------|---------|------------------|-------------|---------------|
| CD3      | SK7  | Ratón   | IgG <sub>1</sub> | APC         | BD Bioscience |

**Tabla 1. Anticuerpo monoclonal para citometría de flujo: Aloficocianina (APC). BD Bioscience (San Jose, CA, USA).**

En todos los casos, las células fueron cultivadas en placas de 6, 12 o 96 pocillos (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania) a una concentración de  $10^6$  células/ml en medio completo y en estufa a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. Para estimular las células T, se utilizaron AcMo anti-CD3 (adherido a la placa) y anti-CD28 (soluble) (ambos de BD Biosciences, San Jose, CA, Estados Unidos). Para posibilitar la adhesión del anticuerpo anti-CD3 a los pocillos, éste se incubó diluido en PBS a una concentración de 5 µg/ml durante dos horas a 37°C. Posteriormente, se retiró el exceso de anti-CD3 no adherido y se bloqueó la placa con medio de cultivo completo durante una hora a 37°C. Finalmente, se eliminó este medio, se incorporaron las células resuspendidas en medio completo y se añadió anti-CD28 a una concentración de 2,5 µg/ml. Las células, estimuladas o no, se incubaron en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de los fármacos IMM, IPM, BKM120 o rapamicina. Previamente al uso de los fármacos (en estado liofilizado), estos fueron reconstituidos en DMSO a una concentración 10 mM y almacenados a -20°C.

### **2.1.2 Estudio de viabilidad/proliferación celular. Ensayo MTT:**

Para valorar la toxicidad y determinar las concentraciones a utilizar de los diferentes fármacos, se evaluó la viabilidad y/o proliferación de las CMNs en presencia de los distintos compuestos mediante el método de reducción del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, Estados Unidos). Es un ensayo colorimétrico que mide la actividad metabólica de las células.

$10^5$  CMNs fueron cultivadas en placas de 96 pocillos con fondo plano y, en ausencia o presencia de anti-CD3/anti-CD28, fueron expuestas a diferentes dosis (0 - 10µM) de los fármacos IMM, IPM, BKM120 o rapamicina.

A los cinco días de cultivo, se añadieron 10 µl/pocillo de MTT a una concentración final de 0,5 mg/ml. Tras incubar durante 2 horas a 37°C, se indujo la rotura de la membrana celular al añadir 100 µl de dodecilsulfato sódico (SDS) 10% (Merck

Millipore, Darmstadt, Alemania) - HCl 0,01N (Panreac, Barcelona, España). La placa se mantuvo en agitación y oscuridad durante 3 horas. Finalmente, se midió la absorbancia de las muestras a 570 nm, con filtro de referencia a 630 nm, en el lector de densidad óptica para placas Tecan Ultra Evolution versión 4.50 (TECAN, Männedorff, Suiza) y con el programa informático XFlour4 (TECAN, Crailsheim, Deutschland).

### **2.1.3 Estudios de fosforilación de proteínas y activación de caspasa 3 mediante western blot:**

Mediante *western blot* se evaluó, en CMN enriquecidas en células T, el efecto de los fármacos sobre la fosforilación de proteínas de la ruta PI3K/Akt/mTOR y la activación de caspasa 3. Para ello las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos ( $5 \times 10^6$  células/pocillo), en ausencia o presencia de anti-CD3/anti-CD28 y de diferentes dosis de los fármacos:

- IMM, IPM y BKM120: 0; 0,5; 1 y 10  $\mu$ M.
- Rapamicina: 0; 0,005; 0,5 y 10  $\mu$ M.

Tras dos días de cultivo, las células fueron recogidas, lavadas con PBS a 1.200 rpm durante 10 minutos y lisadas en tampón de lisis durante 5 minutos en hielo. El tampón de lisis se elaboró con NaCl 140 mM (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), EDTA 10 mM (Merck KGaA), glicerol 10% (Merck KGaA), nonident P-40 1% (Fluka Biochemika, Sigma Aldrich Chemie GsmBH, Buchs, Suiza), Tris-HCl 20 mM pH 7.0 (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, Estados Unidos), PMSF 1 mM (USB Corp., Cleveland, OH, Estados Unidos), ortovanadato de sodio 1 mM (Sigma Aldrich Corp.) y un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, Estados Unidos). Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos a 13.000 rpm y se recogieron los sobrenadantes, en los que se determinó la cantidad de proteína utilizando la solución Bradford Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Múnich, Alemania) y cuantificando la densidad óptica en el lector para placas Tecan Ultra Evolution versión 4.50 con el software XFlour4. Para los estudios se tomaron muestras de 30 – 70  $\mu$ g de proteína que fueron desnaturalizadas en un baño seco a 100°C con tampón de carga de electroforesis 4X, que contiene SDS 8% (Merck Millipore), azul de Bromofenol 0,05% (Sigma-Aldrich Corp.), glicerol 40% (Merck KGaA), Tris-HCl 200 mM pH 6,8 (Sigma Aldrich Corp.) y 2-mercaptoetanol 2% (Sigma-Aldrich Corp.). Tras 5 minutos de incubación, las muestras se cargaron en

geles de poliacrilamida preparados con solución de acrilamida/bis-acrilamida al 30% (Bio-Rad Laboratories, Múnich, Alemania) según Laemmli. El porcentaje de poliacrilamida fue variable dependiendo del peso molecular de la proteína a estudiar. La electroforesis se realizó en cubetas para electroforesis verticales Mini-PROTEAN®II (Bio-Rad Laboratories) aplicando un voltaje de 100 – 120 V. Una vez realizada la separación de proteínas, éstas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, *polyvinylidene fluoride*) (Millipore, Bedford, MA, Estados Unidos) en tampón de transferencia compuesto por Tris-HCl 2,5mM (Sigma Aldrich Corp.), glicina 19,2mM (Affymetrix, Cleveland, Ohio, Estados Unidos) y metanol 10% (v/v) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). La transferencia se realizó aplicando un amperaje constante de 0,50 A durante 1 hora 10 minutos o 1 hora 45 minutos, dependiendo de la concentración de poliacrilamida del gel empleado. A continuación, las membranas se bloquearon durante una hora en agitación suave con una solución de bloqueo preparada a partir de tampón de lavado (20mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl y 0.1% (v/v) Tween-20 (Sigma-Aldrich Corp.)) con 5% (p/v) leche desnatada en polvo “Blotting Grade Blocker” (Bio-Rad Laboratories). Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (tabla 2) a una temperatura de 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se lavó y retiró el exceso de anticuerpo primario con tampón de lavado y las membranas se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario, anti-ratón o anti-conejo, conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (tabla 3). Finalmente, tras lavar y retirar el exceso de anticuerpo secundario, se incubó la membrana con la solución de revelado ELC Western Blotting Detection (GE Healthcare BioSciences, Buckinghamshire, UK) para visualizar las bandas mediante quimioluminiscencia en películas “Medical X-ray films” (FUJIFILM Corp., Minato-Ku, Tokio, Japón).

|              | Antígeno          | Especie | Proveedor                  |
|--------------|-------------------|---------|----------------------------|
| POLICLONALES | caspasa 3         | Conejo  | Cell Signaling Technology® |
|              | p-Akt(T308)       | Conejo  | Cell Signaling Technology® |
|              | p-Akt(S473)       | Conejo  | Cell Signaling Technology® |
|              | Akt               | Conejo  | Cell Signaling Technology® |
| MONOCLONALES | p-p70S6K (T389)   | Ratón   | Cell Signaling Technology® |
|              | p70S6K            | Conejo  | Cell Signaling Technology® |
|              | p-rpS6 (S235/236) | Conejo  | Cell Signaling Technology® |
|              | rpS6              | Conejo  | Cell Signaling Technology® |
|              | p-4E-BP1 (T37/46) | Conejo  | Cell Signaling Technology® |
|              | 4E-BP1            | Conejo  | Cell Signaling Technology® |
|              | GADPH             | Conejo  | Cell Signaling Technology® |
|              | Calnexina         | Conejo  | Enzo® Life Science         |

Tabla 2. Anticuerpos primarios para western blot: Cell Signaling Technology® (Danvers, MA, USA); Enzo® Life Science (Farmingdale, NY, Estados Unidos).

|              | Antígeno   | Especie | Conjugación | Proveedor     |
|--------------|------------|---------|-------------|---------------|
| POLICLONALES | IgG Conejo | Asno    | HRP         | GE Healthcare |
|              | IgG Ratón  | Oveja   | HRP         | GE Healthcare |

Tabla 3. Anticuerpos secundarios para western blot: GE Healthcare, (Buckinghamshire, UK). HRP, peroxidasa de rábano.

#### 2.1.4 Estudios de proliferación:

Para los estudios de proliferación celular se empleó el colorante verde fluorescente PKH67, que se incorpora a la membrana celular y se reparte entre las células hijas tras la división celular. Por tanto, la pérdida de fluorescencia, medida por

citometría de flujo en el canal de detección FL1, es proporcional al grado de proliferación.

El marcaje de las CMNs se realizó siguiendo las instrucciones del kit “PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit” (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos). Las células marcadas fueron sembradas en placas de 96 pocillos con fondo en U (200.000 células/pocillo), en presencia o ausencia de anti-CD3/anti-CD28 y con distintas concentraciones de los fármacos:

- IMM, IPM y BKM120: 0; 0,1; 0,5; 1, 5 y 10  $\mu$ M.
- Rapamicina: 0; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5 y 10  $\mu$ M.

A los cinco días de cultivo, las células fueron centrifugadas y, tras retirar el sobrenadante, se marcaron con AcMo CD3-APC (tabla 1) durante 15 minutos. Después de lavar con PBS a 2.000 rpm durante 5 minutos, las células fueron marcadas con 7-AAD e inmediatamente después se adquirieron en el citómetro FACSCalibur con el soporte informático CellQuest®. Con el programa Infinicyt™ se analizó, en la población de células CD3<sup>+</sup> viables (CD3<sup>+</sup>7-AAD<sup>-</sup>), el porcentaje de células que habían experimentado una o más divisiones celulares (PKH<sup>low</sup>).

#### **2.1.5 Estudios de ciclo celular:**

Se sembraron células T aisladas mediante selección inmunomagnética en placas de 96 pocillos con fondo en U (200.000 células/pocillo) en presencia o ausencia de anti-CD3/anti-CD28 y con distintas concentraciones de los fármacos:

- IMM, IPM y BKM120: 0; 0,1; 0,5; 1; 5 y 10  $\mu$ M.
- Rapamicina: 0; 0,0001; 0,0005; 0,01; 0,5 y 10  $\mu$ M.

Tras 48 horas de cultivo, las células se lavaron con PBS a 2.000 rpm durante 5 minutos y se marcaron con yoduro de propidio (IP) siguiendo las instrucciones del kit “CycleTest DNA Reagent kit” (BD Biosciences, San Jose, CA, Estados Unidos). Finalmente las células se adquirieron en el citómetro FACSCalibur con el soporte informático CellQuest®.

El fluorocromo IP se une a los ácidos nucleicos de doble hebra de forma estequiométrica. Esto permite que, tras degradar el ARN con RNAsa (incluida en el kit), el ADN pueda ser cuantificado por citometría de flujo, ya que la emisión de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN.

El análisis se realizó con los programas Paint-A-Gate-Pro (BD Bioscience), con el que se seleccionó la población de interés, y ModFit LT (Verity Software House, Inc., Topsham, ME, Estados Unidos) para evaluar el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular.

### **2.1.6 Estudios de apoptosis por citometría de flujo:**

Se cultivaron linfocitos T aislados en placas de 96 pocillos con fondo en U (200.000 células/pocillo) en ausencia o presencia de anti-CD3/anti-CD28 y con distintas concentraciones de los fármacos IMM, IPM, BKM120 y rapamicina: 0; 0,1; 0,5; 1; 5 y 10  $\mu$ M.

Transcurridas 48 horas de cultivo, las células fueron centrifugadas a 1.200 rpm durante 10 minutos. Tras retirar el sobrenadante, se marcaron con un AcMo CD3-APC (tabla 1) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavó el exceso de anticuerpo no unido con PBS a 2.000 rpm 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se marcaron las células con anexina-V utilizando el kit "PE Annexin V Apoptosis Detection kit I" (BD Pharmingen™, San Diego, Estados Unidos) según las instrucciones del fabricante. Por último, las células fueron adquiridas en el citómetro FACSCalibur con el programa informático CellQuest®. El porcentaje de células apoptóticas (anexina V<sup>+</sup>) se analizó con el programa Infinicyt.

### **2.1.7 Estudio de citoquinas:**

Se cultivaron células T aisladas en placas de 96 pocillos con fondo en U (200.000 células/pocillo) y, durante 48 horas, fueron o no estimuladas con AcMos anti-CD3/anti-CD28 y tratadas con distintas concentraciones (0; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5 y 10  $\mu$ M) de IMM, IPM, BKM120 o rapamicina. Posteriormente, los sobrenadantes fueron procesados siguiendo las instrucciones del kit "CBA Human Th1/Th2 Cytokine Kit II" (BD Bioscience, San Diego, Estados Unidos), que permite estimar la concentración de las citoquinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en el sobrenadante de los cultivos. Las muestras se adquirieron en un citómetro FACSCalibur con el programa informático CellQuest® y los datos se analizaron con el programa BD CBA Software (BD Bioscience).

### 2.1.8 Estudios de fenotipo y marcadores de activación de linfocitos T:

En este estudio se utilizaron CMNs que fueron sembradas en placas de 96 pocillos con fondo en U (200.000 células/pocillo) con o sin estímulo y a diferentes concentraciones de los fármacos:

- IMM, IPM y BKM120: 0; 0,1; 0,5; 1; 5 y 10  $\mu$ M.
- Rapamicina: 0; 0,0005; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5 y 10  $\mu$ M.

Tras dos días de cultivo se analizó la expresión de los marcadores de activación CD25, IFN- $\gamma$  y granzima B en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Además, se evaluó el porcentaje de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en diferentes estadios de maduración en función de la expresión de CD27 y CD45RA. Para ello se empleó el siguiente panel de anticuerpos (tabla 4):

CD45RA-FITC / IFN- $\gamma$ -PE / CD8-PerCP-Cy5.5 / CD25-PE-Cy7\* / Granzima B-Alexa Fluor® 647 / CD4-APC-Alexa Fluor® 750 / CD27-Brillant Violet 421 / CD3-Brillant Violet 510.

| Antígeno      | Clon   | Especie | Isotipo           | Fluorocromo          | Proveedor       |
|---------------|--------|---------|-------------------|----------------------|-----------------|
| CD3           | OKT3   | Ratón   | IgG <sub>2a</sub> | Brillant Violet 510™ | Biolegend®      |
| CD4           | 13B8.2 | Ratón   | IgG <sub>1</sub>  | APC-Alexa Fluor 750  | Beckman Coulter |
| CD8           | SK1    | Ratón   | IgG <sub>1</sub>  | PerCP-Cy5.5          | BD Bioscience   |
| CD25          | 2A3    | Ratón   | IgG <sub>1</sub>  | PE-Cy7*              | BD Bioscience   |
| CD27          | 0323   | Ratón   | IgG <sub>1</sub>  | Brillant Violet 421™ | Biolegend®      |
| CD45RA        | L48    | Ratón   | IgG <sub>1</sub>  | FITC                 | BD Bioscience   |
| IFN- $\gamma$ | B27    | Ratón   | IgG <sub>1</sub>  | PE                   | BD Pharmingen™  |
| Granzima B    | GB11   | Ratón   | IgG <sub>1</sub>  | Alexa Fluor® 647     | BD Pharmingen™  |

**Tabla 4. Anticuerpos monoclonales para citometría de flujo:** Isotiocianato de Fluoresceína (FITC); Ficoeritrina (PE); Proteína Peridina-Clorofila Cianina 5.5. (PerCP-Cy5.5); Ficoeritrina-Cianina 7 (PE-Cy7\*); Aloficocianina (APC). BD Bioscience (San Jose, CA, USA); BD Pharmingen Bioscience (San Jose, CA, USA); Beckman Coulter (Brea, CA, USA); Biolegend® (San Diego, CA, USA).

Para valorar la expresión de IFN- $\gamma$  y granzima B intracelulares, se añadió el desorganizador del complejo de Golgi “brefeldina A” [10  $\mu\text{g/ml}$ ] (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, Estados Unidos) durante las últimas 4 horas de cultivo con el fin de inhibir la secreción de proteínas. Posteriormente, se centrifugó la placa de cultivo a 1.200 rpm durante 10 minutos y se retiró el sobrenadante. A continuación, las células se incubaron en oscuridad y durante 15 minutos con los AcMo frente a antígenos de superficie: CD45RA, CD8, CD25, CD4, CD27 y CD3. Transcurrido este tiempo, se añadieron 100  $\mu\text{l}$ /pocillo de solución A del Kit de permeabilización de membrana citoplasmática “IntraStain” (Dako, Glostrup, Dinamarca) para fijar la estructura de la membrana celular. Posteriormente, se volvieron a lavar las células con PBS para retirar el exceso de anticuerpo no unido. A continuación, se añadieron los AcMo IFN- $\gamma$  y Granzima B y 100  $\mu\text{l}$ /pocillo de la solución B del mismo kit (detergente que permeabiliza la membrana permitiendo el marcaje intracitoplasmático). Finalmente, las células se lavaron a 2.000rpm durante 5 minutos, se resuspendieron en FACSFlow buffer (BD Bioscience, San Jose, CA, Estados Unidos) y se adquirieron en el citómetro FACSCanto II (BD Bioscience, San Diego, CA, Estados Unidos) con el programa informático FACS DIVA (BD Bioscience). El análisis del fenotipo de los linfocitos T se realizó con el programa Infinicyt.

### **2.1.9 Detección de células secretoras de IFN- $\gamma$ mediante ELISPOT:**

Tras obtener CMNs de donantes CMV-seropositivos, se aislaron monocitos por selección inmunomagnética con microesferas anti-CD14 humano (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) en el separador AutoMACS y se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso.

Para activar las CMNs del donante CMV-seropositivo (células respondedoras) frente a las CMNs de un segundo donante (células diana alogénicas), ambas poblaciones fueron cultivadas en placas de 12 pocillos en una proporción células respondedoras:células diana 2:1. Para evitar la activación de las células diana, éstas fueron previamente irradiadas (25Gy) en un irradiador de muestras biológicas Gammacell 1000 Elite (Fuente: Cesio 137; actividad: 12,8TBq en Septiembre de 2006) (MDS Nordion, Ottawa, Canadá). Este primer co-cultivo o cultivo mixto unidireccional, se mantuvo durante 96 horas en ausencia o presencia de uno de los cuatro fármacos a diferentes concentraciones:

- IMM, IPM y BKM120: 0; 1 y 10  $\mu\text{M}$ .

- Rapamicina: 0; 0,5 y 10  $\mu$ M.

Pasado este tiempo, se recogieron las células respondedoras de cada pocillo, se lavaron a 1.200 rpm durante 10 minutos, se resuspendieron en medio completo y se determinó el número de células viables mediante conteo con azul tripán. Tras ajustar a una concentración de  $10^6$  células/ml, se sembraron  $10^5$  células respondedoras en placas de ELISPOT IFN- $\gamma$  (placas de 96 pocillos precargadas con AcMo anti-IFN- $\gamma$ ), previamente bloqueadas siguiendo las instrucciones del Kit ELISpot<sup>PRO</sup> para IFN- $\gamma$  (Mabtech AB, Nacka Strand Sweden). En este segundo cultivo se establecieron diferentes condiciones para todas y cada una de las muestras del cultivo inicial y siempre en ausencia de fármacos:

- a) ausencia de estímulo, como control de la secreción de IFN- $\gamma$  que persiste tras la primera estimulación en cultivo mixto;
- b) re-estimuladas con  $5 \times 10^5$  células diana irradiadas del mismo donante del primer co-cultivo;
- c) re-estimuladas con la proteína recombinante pp65 de citomegalovirus (CMV-pp65) (Miltenyi Biotec) (2  $\mu$ l/pocillo, siguiendo las recomendaciones del fabricante);
- d) re-estimuladas con un AcMo anti-CD3-2 (incluido en el kit ELISPOT IFN- $\gamma$ ), como control positivo de estimulación.

En cada uno de los pocillos se añadieron  $2 \times 10^4$  monocitos del donante CMV-seropositivo, como fuente de APCs para posibilitar la presentación antigénica de los péptidos de CMV y la consecuente activación de las células T respondedoras CMV-específicas.

Tras mantener el segundo co-cultivo durante 36 horas en estufa, la placa se procesó siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, la placa se lavó con PBS y en cada pocillo se añadieron 100  $\mu$ l de AcMo anti-IFN- $\gamma$  conjugado con la enzima fosfatasa alcalina. Tras 2 horas de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se lavó el exceso de anticuerpo y se añadieron 100  $\mu$ l por pocillo de la solución de revelado BCIP/NBT-plus para detectar el IFN- $\gamma$  secretado y unido a la placa. Se visualizaron una serie de puntos (spots), correspondiendo cada punto a una célula secretora de IFN- $\gamma$ . Los puntos fueron cuantificados utilizando el lector "ImmunoSpot ELISPOT" (Cellular Technology Limited, Aale, Alemania) y los programas informáticos "Image Acquisition 4.5" y "Shortcut to Immunospot 3".

## 2.2 Estudios *in vivo*.

### 2.2.1 Irradiación y trasplante:

El modelo murino de EICH utilizado se basa en un trasplante hematopoyético con incompatibilidad MHC, en el que se emplean como donantes ratones machos de la cepa C57BL/6 con haplotipo H2b y como receptores ratones hembras de la cepa BALB/c con haplotipo H2d.

**a) Irradiación:** todo los ratones receptores BALB/c se sometieron a una irradiación corporal letal de 850 cGy dividida en dos tandas de 425 cGy separadas por 4 horas. La irradiación se realizó en un irradiador de muestras biológicas Gammacell 1000 Elite, donde los ratones fueron expuestos de forma homogénea a una fuente de irradiación de Cesio 137.

**b) Trasplante:** para el trasplante de médula ósea (MO) y generación de EICH en los ratones receptores BALB/c, se emplearon células de la MO y esplenocitos de los ratones donantes C57BL/6, que fueron sacrificados por dislocación cervical. La manipulación de los animales y de las células se realizó en condiciones de esterilidad en campanas de flujo laminar.

- **Obtención de células de MO:** se extrajeron células de la MO a partir de los fémures y de las tibias de los ratones donantes. Para ello, se introdujo RPMI 1640 a presión por el canal medular de los huesos, usando agujas de 25G BD Microlance™ 3, 25Gx5/8" 0,5x16mm, (Becton Dickinson & Co. Ltd., Drogheda, Irlanda) acopladas a jeringa de 1ml (BD Plastipak™, Becton Dickinson, Madrid, España). La suspensión celular resultante se pasó a través de filtros de 40 µm de poro (Corning Incorporated, Corning, NY, Estados Unidos) y, tras ser centrifugada a 1.200 rpm durante 10 minutos y resuspendida en RPMI, se procedió a su recuento con azul tripán en cámara de Neubauer.

- **Obtención de células maduras del bazo o esplenocitos:** el bazo se disgregó mecánicamente con dos portas esmerilados y, tras añadir RPMI, el producto obtenido se filtró a través de filtros de 40 µm de poro, se lavó mediante centrifugación y se determinó el número de células.

Tanto las células de MO como las de bazo se resuspendieron en medio RPMI 1640 con penicilina [100 U/ml] y estreptomycinina [100 µg/ml] para ser inyectadas en los ratones receptores. Cuatro horas después de la segunda dosis de irradiación, todos

los ratones BALB/c, excepto el control de irradiación, recibieron  $10 \times 10^6$  de células de MO con o sin  $5 \times 10^6$  de esplenocitos en un volumen total de 200  $\mu$ l. La administración se realizó por vía intravenosa a través de las venas laterales de la cola del ratón, utilizando para ello jeringas de insulina de 0,5ml con aguja montada de 27Gx1/2"-0,4x12mm, TERUMO, (Somerset, NJ, Estados Unidos).

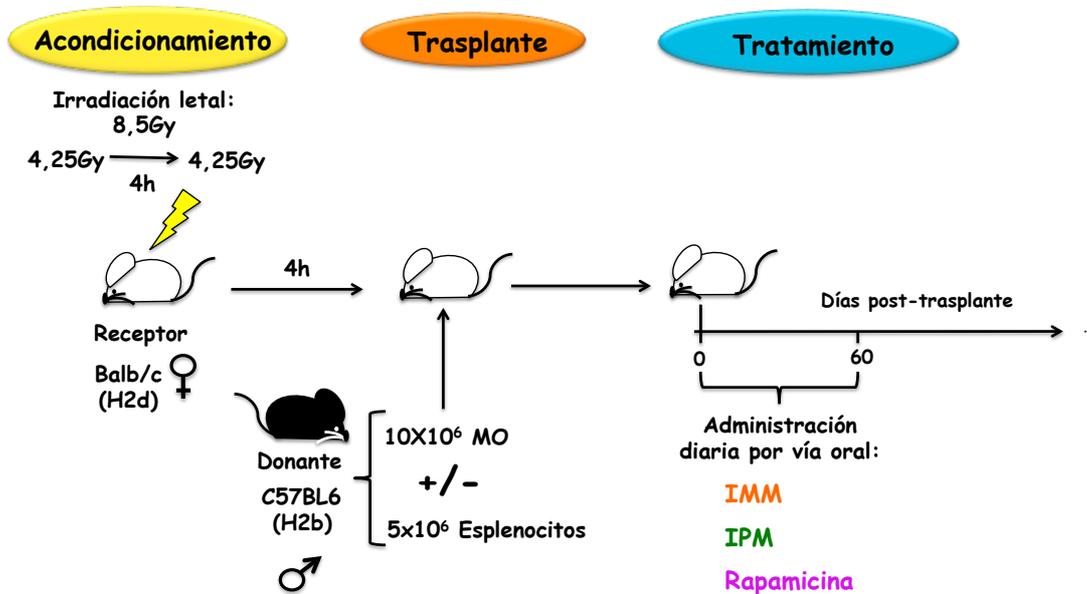


Figura 9. Modelo murino de EICH aguda.

### 2.2.2 Grupos experimentales:

Se diseñaron 6 grupos experimentales:

**Grupo 1. TBI (total body irradiation):** control de irradiación. No recibió células tras la irradiación

**Grupo 2. MO:** control de MO. Tras la irradiación recibieron  $10 \times 10^6$  de células de MO.

**Grupo 3. EICH:** control de EICH. Recibieron  $10 \times 10^6$  de células de MO +  $5 \times 10^6$  de esplenocitos.

**Grupo 4. EICH+IMM:** profilaxis de EICH con IMM. Recibieron  $10 \times 10^6$  de células de MO +  $5 \times 10^6$  de esplenocitos + IMM [20 mg/kg].

**Grupo 5. EICH+IPM:** profilaxis de EICH con IPM. Recibieron  $10 \times 10^6$  de células de MO +  $5 \times 10^6$  de esplenocitos + IPM [5 mg/kg].

**Grupo 6. EICH+rapamicina:** control de profilaxis de EICH con rapamicina. Recibieron  $10 \times 10^6$  de células de MO +  $5 \times 10^6$  de esplenocitos + rapamicina [1,5 mg/kg].

Se realizaron 4 experimentos con al menos 3 ratones/grupo en los grupos 3, 4 y 5; 1 ratón en el grupo TBI y 2 en los grupos 2 y 6.

| GRUPO                | Irradiación (850cGy) | Células de la médula ósea | Esplenocitos | Fármaco                   |
|----------------------|----------------------|---------------------------|--------------|---------------------------|
| 1. TBI               | SÍ                   | NO                        | NO           | NO                        |
| 2. MO                | SÍ                   | SÍ                        | NO           | NO                        |
| 3. EICH              | SÍ                   | SÍ                        | SÍ           | NO                        |
| 4. EICH + IMM        | SÍ                   | SÍ                        | SÍ           | IMM<br>[20 mg/Kg]         |
| 5. EICH + IPM        | SÍ                   | SÍ                        | SÍ           | IPM<br>[5 mg/Kg]          |
| 6. EICH + rapamicina | SÍ                   | SÍ                        | SÍ           | Rapamicina<br>[1,5 mg/Kg] |

Tabla 5. Grupos experimentales del modelo murino de EICH para evaluar el efecto de los inhibidores de la vía PI3K/Akt/mTOR.

### 2.2.3 Administración de los fármacos:

La manipulación y administración de los fármacos se realizó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar.

Los fármacos se administraron diariamente, durante los primeros 60 días postrasplante, por vía oral a través de una cánula de alimentación Flushing 0,7/25mm de 22G (Twister Medical, Barcelona, España).

#### Preparación de los fármacos:

**IPM:** el fármaco liofilizado fue disuelto diariamente en una solución de NMP/PEG 300 (1/10 v/v) y administrado después de un periodo no superior a los 30 minutos tras ser preparado. Primero se disolvió el fármaco en NMP a 90°C durante 5 minutos y posteriormente se mezcló con PEG 300 para administrarlo a una concentración final de IPM de 5mg/Kg.

**IMM:** el fármaco liofilizado fue disuelto diariamente en agua ultrapura MilliQ con 0,5% de CMC y 0,25% de Tween 80, administrando una concentración final de fármaco de 20mg/Kg.

**Rapamicina:** fue reconstituida con etanol puro, preparando un stock de 10 mg/ml que fue congelado a -20°C. A partir de este preparado, la rapamicina se diluyó en una suspensión de agua ultrapura MilliQ con 0,2% de CMC y 0,25% de Tween 80 y se administró a una concentración final de 1,5mg/Kg.

El volumen de administración de cada fármaco se ajustó a 100 µl/20 gr de peso del animal.

#### **2.2.4 Monitorización:**

Para analizar el efecto de los fármacos, los ratones fueron valorados individualmente a diario durante los primeros 60 días postrasplante y, posteriormente, tres veces por semana. La evaluación se realizó en condiciones de esterilidad en campanas de flujo laminar. Se valoró la supervivencia y la aparición de signos de EICH (pérdida de peso, encorvamiento, disminución de la actividad, erizamiento del pelo y aparición de áreas desnudas en la piel), que fueron puntuados con 0, 1 o 2 según la gravedad de los signos, como ha sido previamente descrito por Cooke y col. [143]. Posteriormente, para cada día, se sumó la puntuación de todos los parámetros, obteniendo un valor entre 0 y 10.

#### **2.2.5 Examen histopatológico de tejidos:**

Tras la tercera y novena semana postrasplante, se evaluó mediante estudios histopatológicos el daño en tejidos diana de la EICH como piel, hígado, intestino grueso e intestino delgado. Para la extracción de los órganos, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Se tomaron muestras de piel de la zona de la nuca y orejas, del hígado y se lavó el intestino grueso y el intestino delgado con PBS para su posterior procesamiento. Las muestras fueron fijadas en formalina al 10% (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, Estados Unidos), deshidratadas, incluidas en parafina, cortadas con microtomo en secciones de 4 µm, montadas en portas y teñidas con hematoxilina y eosina (ambos de Merck KGaA, Darmstadt, Germany) para evaluar

su morfología por microscopio óptico. La severidad de la EICH en cada muestra fue valorada por un patólogo especialista siguiendo los criterios descritos en la tabla 6.

| PUNTUACIÓN | PIEL  | HÍGADO  | INTESTINO GRUESO y DELGADO  |
|------------|---|---|---|
| 0          | Normal  | Normal  | Normal  |
| 0,5        |   | Leve infiltrado linfocitario en algunos espacios periportales             | Rara u ocasional presencia de cuerpos apoptóticos                         |
| 1          | Degeneración vacuolar de la capa basal epidérmica   | Leve infiltrado linfocitario en numerosos espacios periportales           | Cuerpos apoptóticos aislados sin pérdida de criptas                       |
| 2          | Presencia de células disqueratóticas apoptóticas en la epidermis y/o en el epitelio folicular, así como infiltrado linfocitario | Lesión celular leve o invasión linfocitaria en algunos conductos biliares | Pérdida de alguna cripta. Regeneración epitelial                          |
| 3          | Formación de fisuras o microvesículas subepidérmicas  | Múltiples focos de lesión y regeneración en algunos conductos biliares    | Áreas contiguas con pérdida de criptas                                    |
| 4          | Separación de la epidermis de la dermis   | Daño y destrucción de numerosos conductos biliares                        | Extensas áreas con pérdidas de criptas y con desprendimiento del epitelio |

Tabla 6. Criterios para establecer una puntuación de daño tisular en órganos diana de EICH.

### 2.3 Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el programa “IBM SPSS Statistics 20” (Chicago, IL, Estados Unidos). Las diferencias entre las distintas dosis de los fármacos se analizaron por la prueba no paramétrica para k muestras independientes de Kruskal-Wallis. Las comparaciones por parejas se realizaron mediante la prueba de Mann Whitney con la corrección de Bonferroni. Las curvas de supervivencia se representaron por el método de Kaplan-Meier y se utilizó la prueba de log-rank para comparar las tasas de supervivencia. En todas las pruebas se estableció una significación estadística de  $p < 0,05$ .

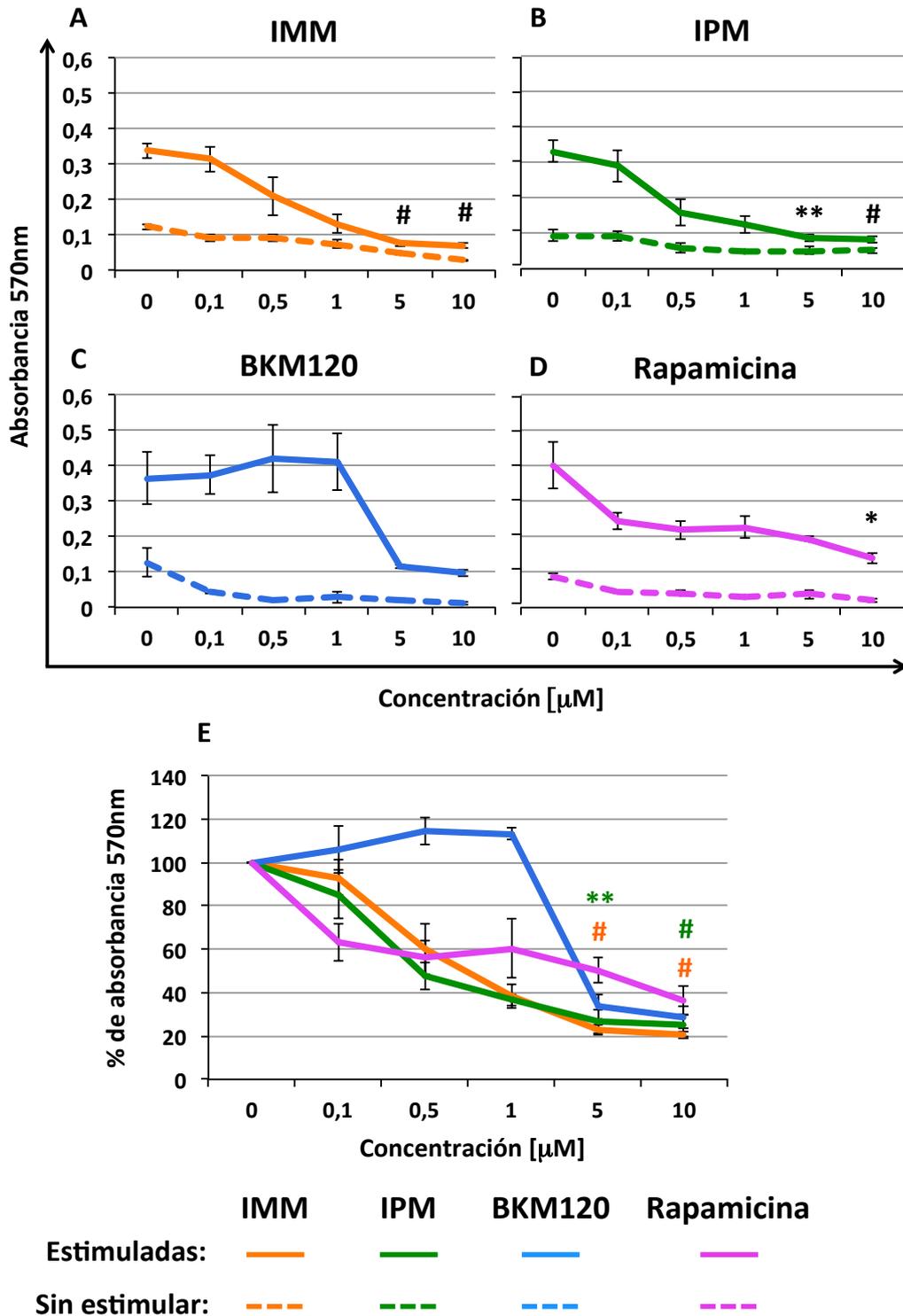


# **RESULTADOS**



## 1. Establecimiento de la dosis de los inhibidores de la ruta PI3K/Akt/mTOR.

Con el objetivo de valorar el efecto de los fármacos y definir las dosis a utilizar en los estudios posteriores, se cultivaron CMNs en ausencia o presencia de anti-CD3/anti-CD28 y tratadas con distintas concentraciones de IMM, IPM, BKM120 o rapamicina. A los 5 días se evaluó la actividad metabólica de las células. En la figura 10 (A-D) se observa que en los cultivos no estimulados, en los que las células apenas proliferan y mantienen una actividad metabólica baja, los niveles de absorbancia son bajos y apenas varían en presencia de los fármacos. La estimulación provocó un aumento de la absorbancia como consecuencia del incremento en el número y la actividad metabólica de las células T. La adición de los distintos fármacos a las células estimuladas disminuyó los niveles de absorbancia, reflejando su efecto citotóxico. A bajas concentraciones rapamicina fue el fármaco más tóxico, mientras que a altas dosis el resto de inhibidores resultaron más efectivos. De ellos, el inhibidor de PI3K BKM120 solo resultó efectivo a concentraciones superiores a 1  $\mu\text{M}$ , mientras que IMM e IPM indujeron un descenso progresivo de la actividad metabólica con el incremento de la dosis (figura 10).



**Figura 10. Efecto de los inhibidores de la ruta PI3K/Akt/mTOR sobre CMNs:** Absorbancia a 570nm en cultivos de CMNs estimuladas o no con anti-CD3/anti-CD28 y tratadas con distintas concentraciones de IMM (A), IPM (B), BKM120 (C) y rapamicina (D), evaluada mediante el método de reducción de MTT tras 5 días de cultivo. E) Porcentaje de absorbancia de las células estimuladas y tratadas normalizado con respecto a las células estimuladas no tratadas. En las gráficas se representa la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) de los estudios realizados: rapamicina, n=3; IMM, n=7; BKM120, n=3; IPM, n=7. \*p<0,05; \*\*p<0,01; #p $\leq$ 0,001 con respecto a las células estimuladas en ausencia de fármaco.

## **2. IMM, IPM, BKM120 y rapamicina bloquean la fosforilación de proteínas de la ruta PI3K/Akt/mTOR.**

Tras comprobar el efecto citotóxico de los inhibidores, se evaluó el efecto que ejercen en la fosforilación de proteínas de la ruta PI3K/Akt/mTOR. Para ello, se cultivaron CMNs enriquecidas en linfocitos T durante 48 horas en ausencia o presencia de anti-CD3/anti-CD28 y con diferentes concentraciones de rapamicina, IMM, BKM120 y IPM.

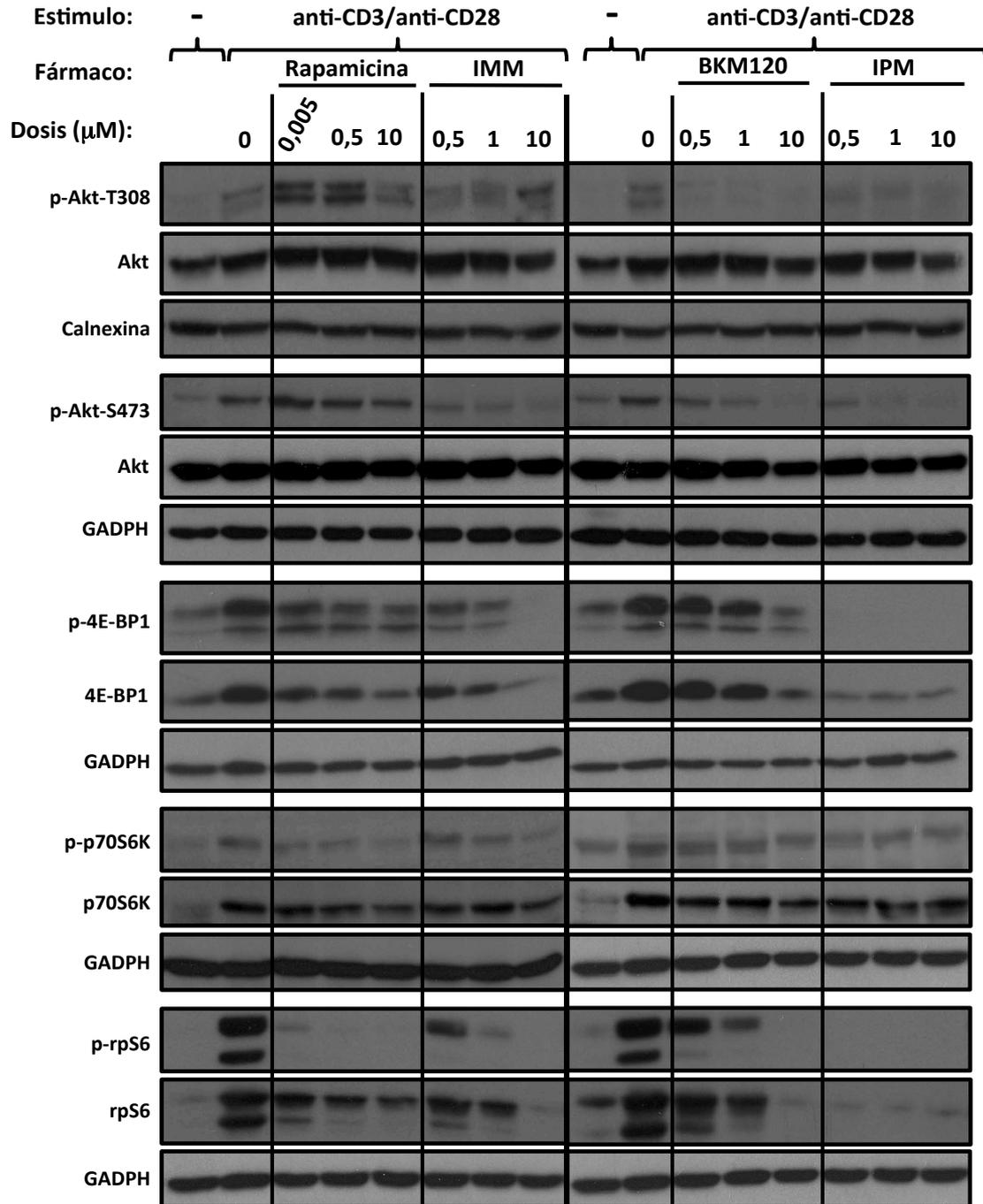
Como se aprecia en la figura 11, la estimulación de las células indujo la fosforilación de las proteínas Akt, 4E-BP1, p70S6K y rpS6. La adición de los distintos fármacos al cultivo dio lugar a cambios en dicha fosforilación.

Con respecto a la fosforilación de Akt en el residuo T308 (p-Akt T308), inducida por la señalización de PI3K, disminuyó con IPM y con BKM120. Sin embargo, ni rapamicina ni IMM fueron capaces de disminuir su fosforilación, que incluso se incrementó a determinadas dosis de ambos fármacos. La fosforilación de Akt S473, diana de mTORC2, descendió en presencia de IMM, BKM120 o IPM, pero no de rapamicina, con la que incluso aumentó.

Los fármacos disminuyeron la fosforilación de los efectores de mTORC1, 4E-BP1 y p70S6K, así como la fosforilación de rpS6, diana de p70S6K, siendo IPM el inhibidor más efectivo. Rapamicina, a pesar de disminuir la fosforilación de p70S6K y anular por completo la de rpS6, redujo débilmente los niveles de p-4E-BP1.

Por otra parte, en presencia de los inhibidores, especialmente IPM, no sólo descendió la fosforilación de 4E-BP1 y rpS6, sino también su expresión.

Por tanto, podemos concluir que IMM e IPM inhiben de manera más eficaz que rapamicina y BKM120 la señalización a través de mTORC1. Además, a diferencia de rapamicina, tanto IMM e IPM como BKM120, bloquean la actividad de mTORC2.

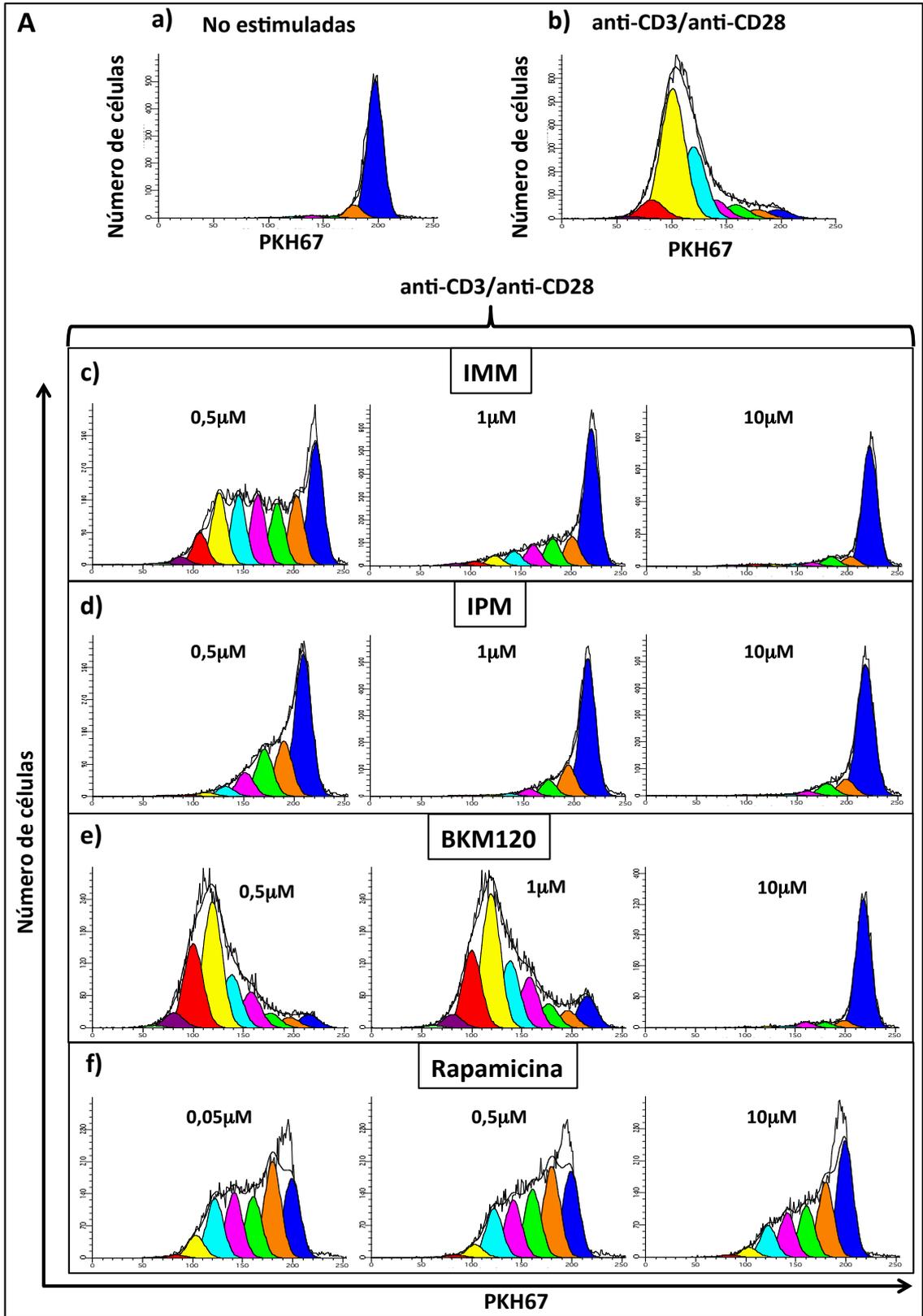


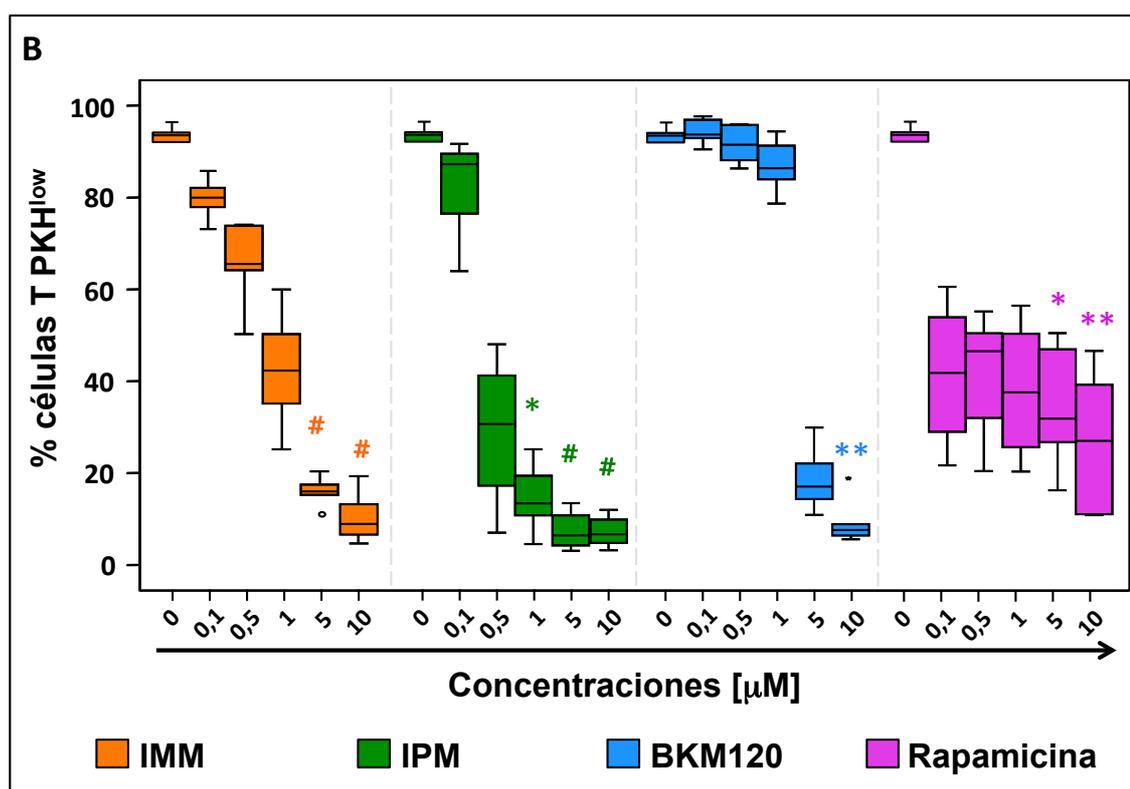
**Figura 11. Efecto de los inhibidores de la ruta PI3K/Akt/mTOR sobre la fosforilación de proteínas de la ruta:** Análisis mediante western blot de los niveles de Akt fosforilado (p-Akt) (T308 y S473), Akt total, p-4E-BP1 (T37/46), 4E-BP1 total, p-p70S6K (T389), p70S6K total, p-rpS6R (S235/236) y rpS6R total en cultivos de CMNs enriquecidas en linfocitos T, estimulados o no con anti-CD3/anti-CD28 y tratadas con diferentes concentraciones de rapamicina, IMM, BKM120 y IPM durante 48 horas. Se realizaron al menos tres experimentos independientes.

### **3. IMM, IPM, BKM120 y rapamicina disminuyen la proliferación de células T estimuladas.**

A continuación, evaluamos el efecto de los fármacos sobre la proliferación de los linfocitos T.

Para ello, se cultivaron CMNs marcadas con el colorante verde fluorescente PKH67 en ausencia o presencia de anti-CD3/anti-CD28 y se trataron con distintas concentraciones de IMM, IPM, BKM120 o rapamicina. A los 5 días se analizó, dentro de la población de células T viables (CD3<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>), la pérdida de fluorescencia verde, proporcional al grado de proliferación. IMM e IPM redujeron la proliferación de manera efectiva. BKM120 provocó el mismo efecto, aunque solo a altas dosis, mientras que la acción de rapamicina fue menor (figura 12).



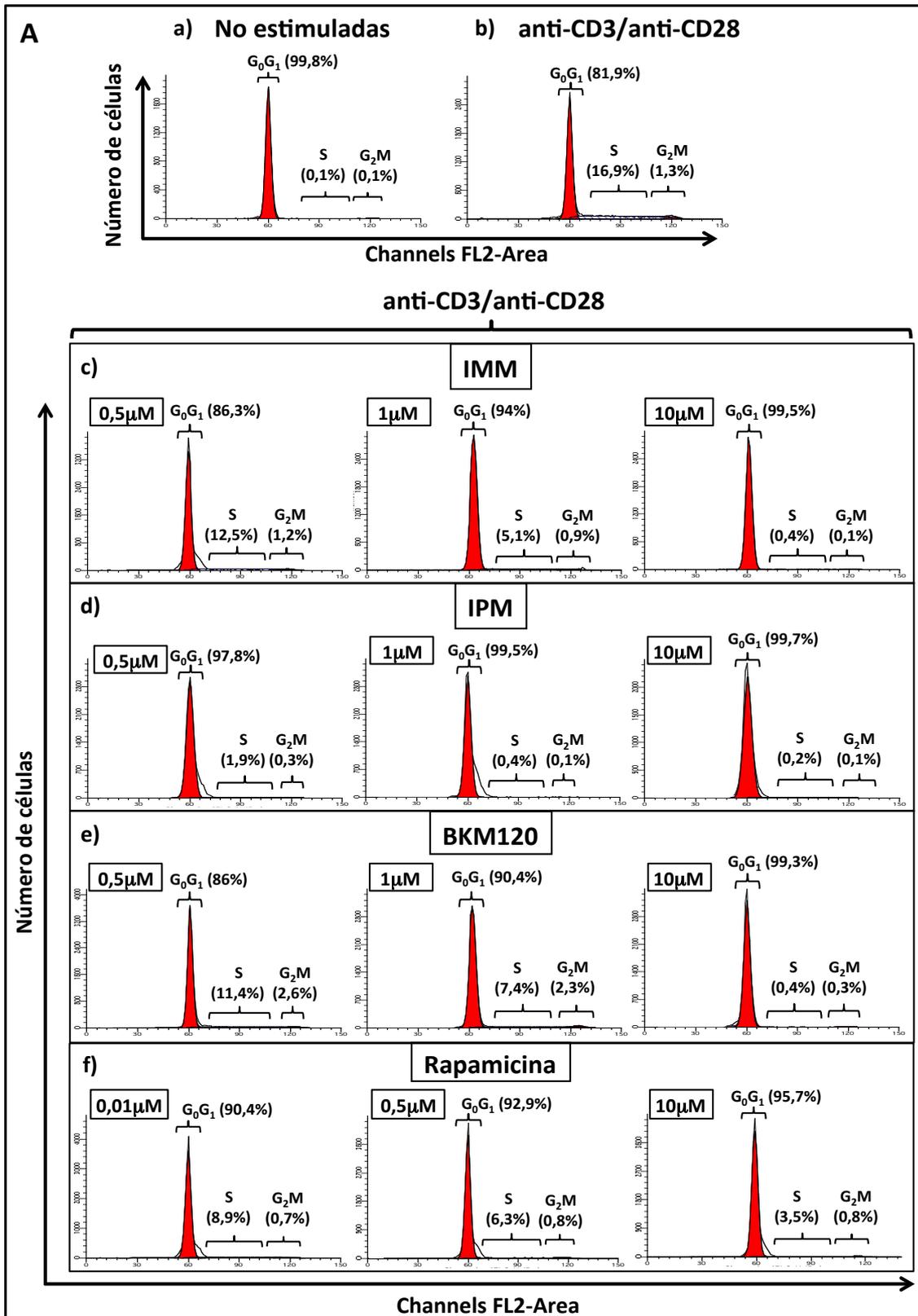


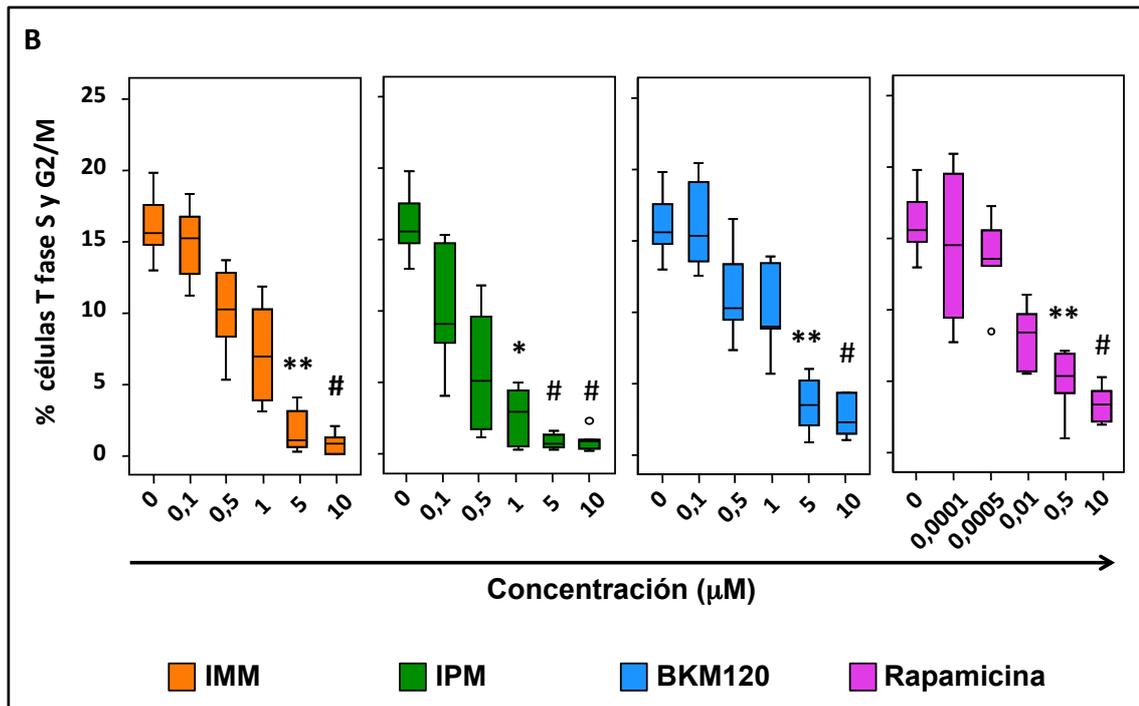
**Figura 12. Efecto de los inhibidores de la ruta PI3K/Akt/mTOR sobre la proliferación de las células T:** **A)** Representación del número de divisiones celulares (número de picos) y del número de células en cada división, de células T cultivadas en ausencia (a) o presencia (b-f) de anti-CD3/anti-CD28 y tratadas con IMM (c), IPM (d), BKM120 (e) o rapamicina (f). Se muestra un caso representativo de 6 estudios realizados. **B)** Representación en diagrama de cajas del porcentaje de células T estimuladas que han sufrido una o más divisiones celulares (n=6). \*p<0,05; \*\*p<0,01; #p≤0,001 con respecto a las células estimuladas en ausencia de fármaco.

#### 4. IMM, IPM, BKM120 y rapamicina inducen parada del ciclo celular pero no apoptosis en células T estimuladas.

Posteriormente, se evaluó si la disminución en la proliferación provocada por los fármacos se debía a la inducción de parada del ciclo celular, de apoptosis o de ambos mecanismos. Para ello, se cultivaron células T, estimuladas o no, en presencia de los fármacos IMM, IPM, BKM120 o rapamicina.

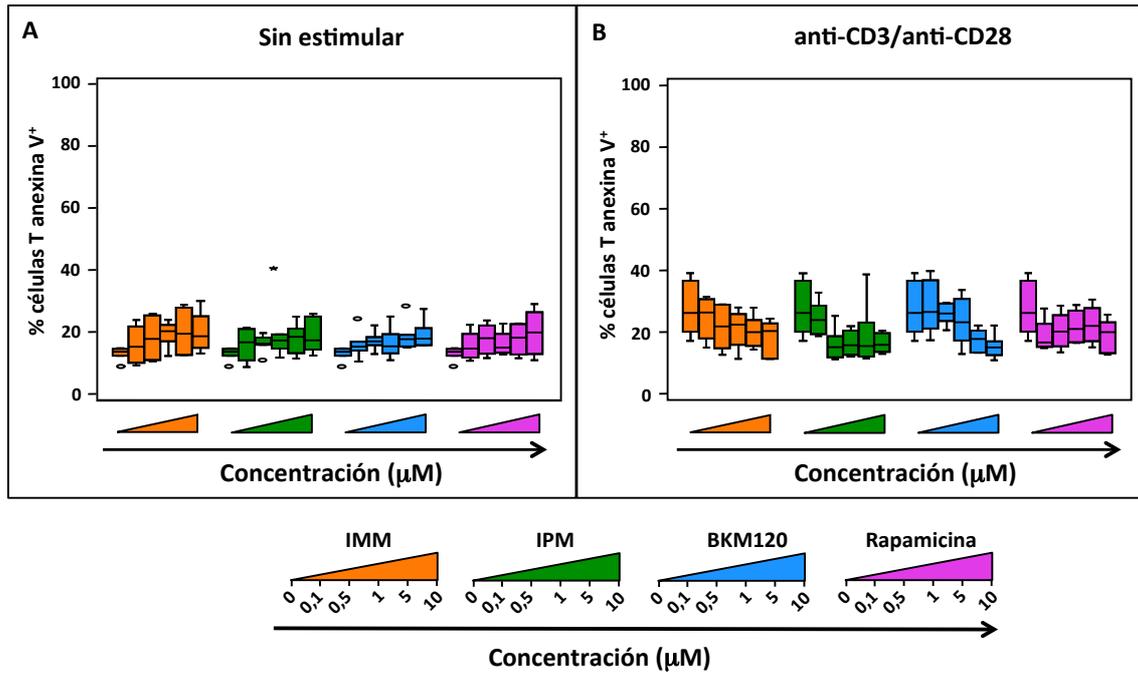
Tras 4 días de cultivo, se evaluó la proporción de células T en cada una de las fases del ciclo celular. Observamos que la estimulación con anti-CD3/anti-CD28 incrementó el porcentaje de células en fases S y G<sub>2</sub>/M, pero el tratamiento con los fármacos disminuyó dicho porcentaje (figura 13).





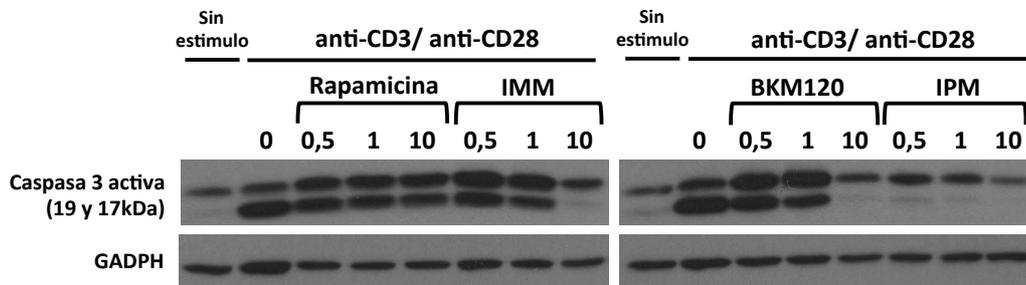
**13. Efecto de los inhibidores de la ruta PI3K/Akt/mTOR en la progresión del ciclo celular en linfocitos T:** **A)** Porcentaje de células en fase  $G_0G_1$ , S y  $G_2/M$  cultivadas en ausencia (a) o presencia de anti-CD3/anti-CD28 (b-f) y con distintas concentraciones de IMM (c), IPM (d), BKM120 (e) o rapamicina (f). Se muestra un caso representativo de 6 experimentos realizados. **B)** Representación en diagrama de cajas del porcentaje de células T estimuladas en fase de S y  $G_2/M$  (n=6). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; # $p \leq 0,001$  con respecto a las células estimuladas en ausencia de fármaco.

Para analizar la inducción de apoptosis se marcaron las células con anexina V tras 48 de cultivo y se analizó el porcentaje de células apoptóticas (anexina  $V^+$ ). La adición de los fármacos a las células no estimuladas indujo un ligero incremento del porcentaje de células anexina  $V^+$ . Por el contrario, en las células estimuladas, los fármacos disminuyeron, también de manera leve, dicho marcaje. En ningún caso estas variaciones fueron significativas (figura 14).



**14. Efecto de los inhibidores de la ruta PI3K/Akt/mTOR en la inducción de apoptosis en linfocitos T:** porcentaje de células apoptóticas (anexina V<sup>+</sup>) en células T no estimuladas (**A**) o estimuladas con anti-CD3/anti-CD28 (**B**) y tratadas con IMM, IPM, BKM120 o rapamicina a distintas concentraciones (n=4).

Por otra parte, se estudió mediante western blot el efecto de los fármacos en la activación (proteólisis) de la caspasa 3 en células estimuladas. Como se observa en la figura 15, la estimulación incrementó la cantidad de caspasa 3 activa (fragmentos de 17 y 19 kDa). La adición de los fármacos no aumentó la activación de caspasa 3. Es más, tanto IMM como BKM120 y IPM provocaron una disminución de caspasa 3 activa con respecto a las células estimuladas no tratadas.



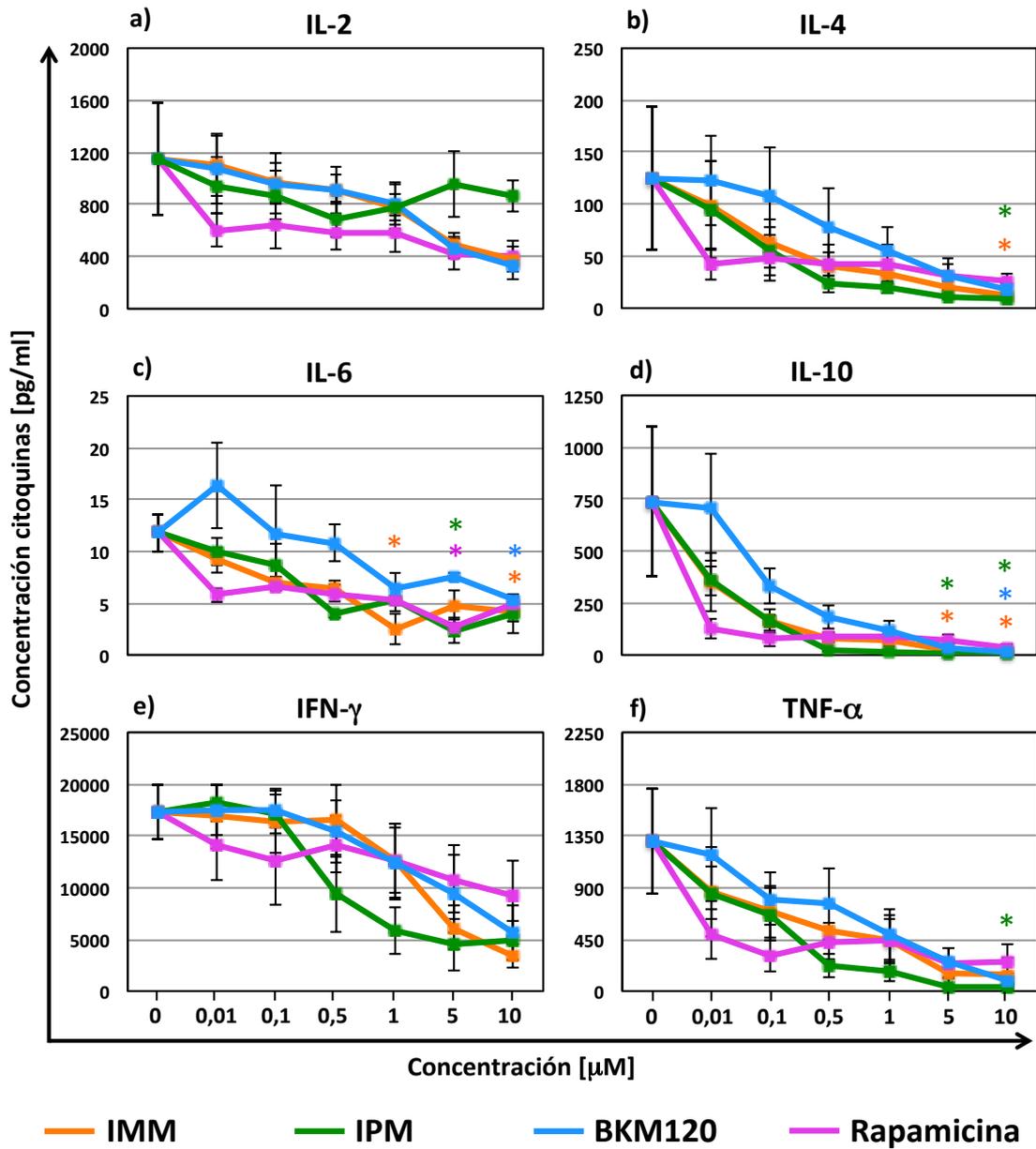
**Figura 15. Efecto de los inhibidores de la ruta PI3K/Akt/mTOR en la activación de caspasa 3:** Análisis de caspasa 3 activada en cultivos de CMNs enriquecidas en linfocitos T, estimulados o no con anti-CD3/anti-CD28 y tratadas con diferentes concentraciones de rapamicina, IMM, BKM120 y IPM durante 48 horas. Caso representativo de tres estudios independientes.

Por tanto, los fármacos no inducen apoptosis de células T pero bloquean la progresión del ciclo celular en células T estimuladas.

#### **5. IMM, IPM, BKM120 y rapamicina reducen la secreción de citoquinas de respuesta Th1 y Th2 en células T estimuladas.**

Para analizar el efecto de los fármacos sobre la secreción de citoquinas de respuesta Th1 y Th2, se cultivaron células T aisladas con anti-CD3/anti-CD28 en presencia de distintas concentraciones de los fármacos y, tras 48 horas, se analizó la concentración de citoquinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) presentes en el sobrenadante.

Como se aprecia en la figura 16, por lo general, los fármacos redujeron de manera dosis-dependiente la secreción de todas las citoquinas estudiadas. Aunque, a bajas concentraciones IPM disminuye la concentración de IL-2 presente en el sobrenadante, a partir de 1  $\mu$ M la incrementa sin alcanzar los niveles secretados en ausencia de tratamiento.

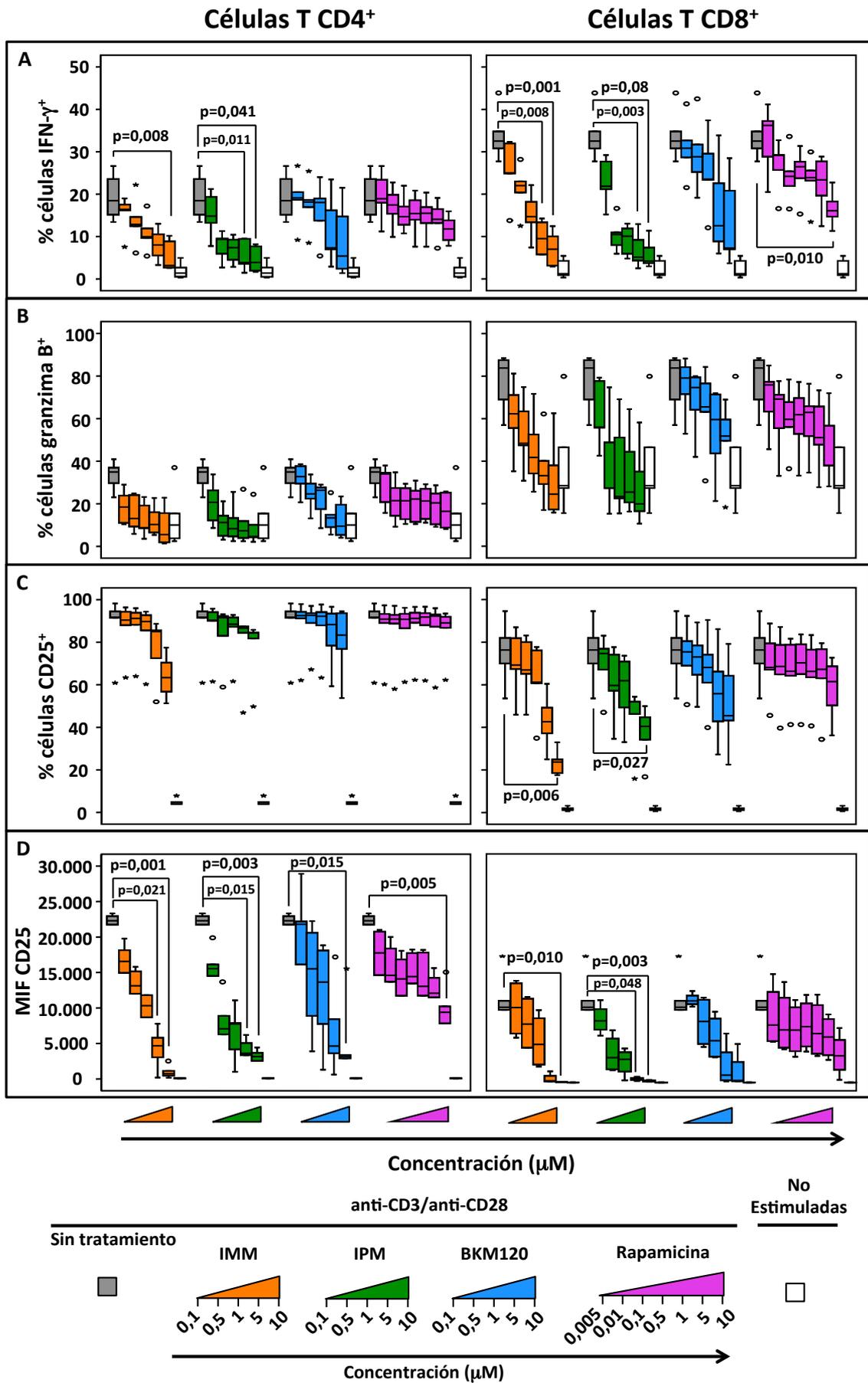


16. Efecto de los inhibidores de la ruta PI3K/Akt/mTOR en la secreción de citoquinas de respuesta Th1 y Th2 por células T estimuladas: concentración de IL-2 (a), IL-4 (b), IL-6 (c), IL-10 (d), IFN-γ (e) y TNF-α (f). Los resultados representan la media ± EEM de 4 experimentos independientes. \*p<0,05 con respecto a las células estimuladas en ausencia de fármaco.

## **6. IMM, IPM, BKM120 y rapamicina reducen la expresión de marcadores de activación en células T estimuladas.**

A continuación, se evaluó la expresión de los marcadores de activación CD25, IFN- $\gamma$  y granzima B en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> tras el cultivo de CMNs con o sin anti-CD3/anti-CD28 y en presencia de distintas concentraciones de IMM, IPM, BKM120 y rapamicina.

La adición de los fármacos causó una disminución del porcentaje de células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (figura 17A) y granzima B<sup>+</sup> (figura 17B) en comparación con las células estimuladas en ausencia de fármaco, tanto en células CD4<sup>+</sup> como en CD8<sup>+</sup>. BKM120, IPM y, en mayor medida IMM, disminuyeron el porcentaje de células CD25<sup>+</sup>, principalmente en células CD8<sup>+</sup>. Aunque este descenso fue leve en las células tratadas con rapamicina, especialmente en las CD4<sup>+</sup>, la mediana de la intensidad de fluorescencia (MIF) disminuyó de manera significativa con la adición del fármaco (figuras 17C y D).

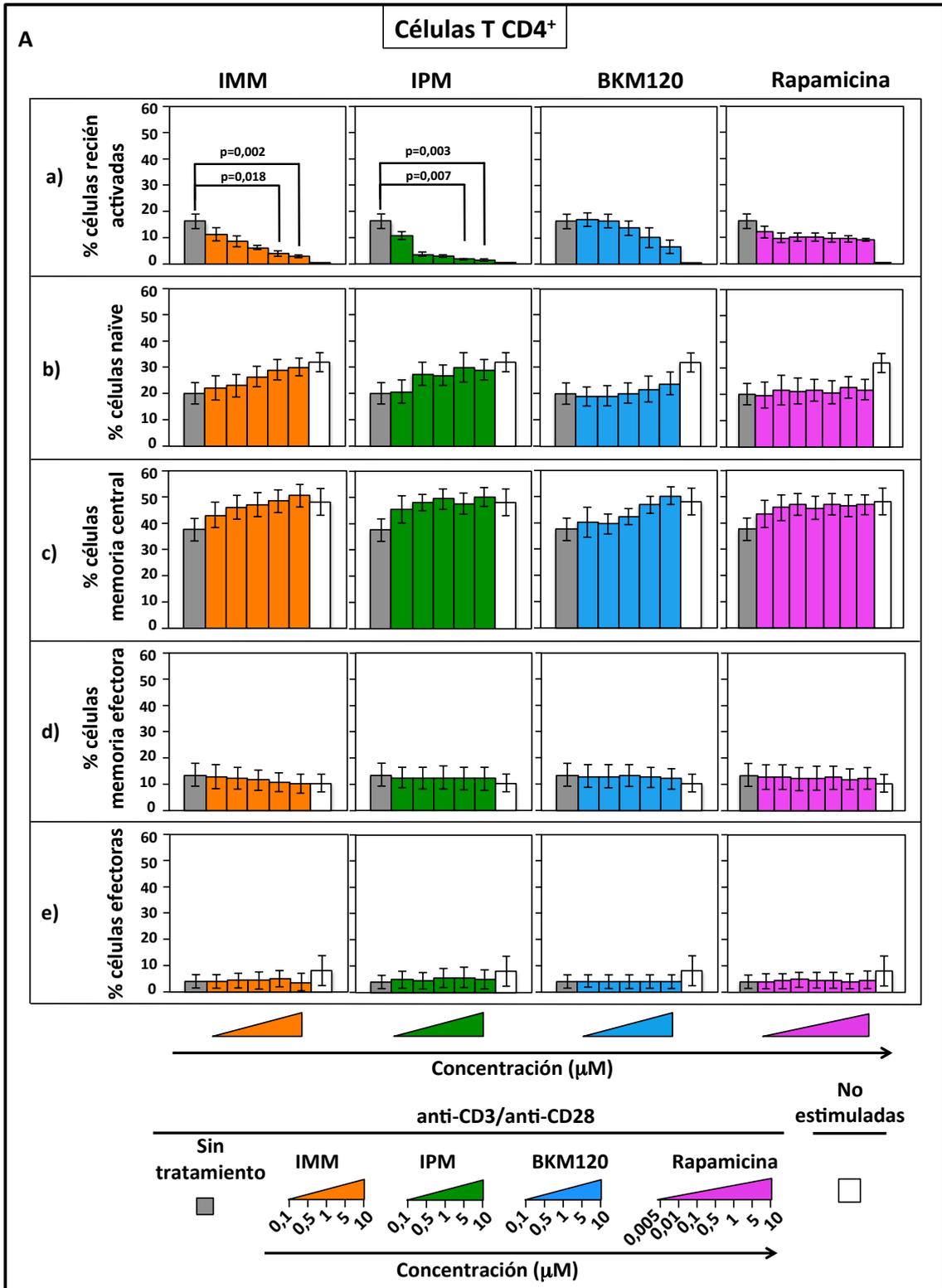


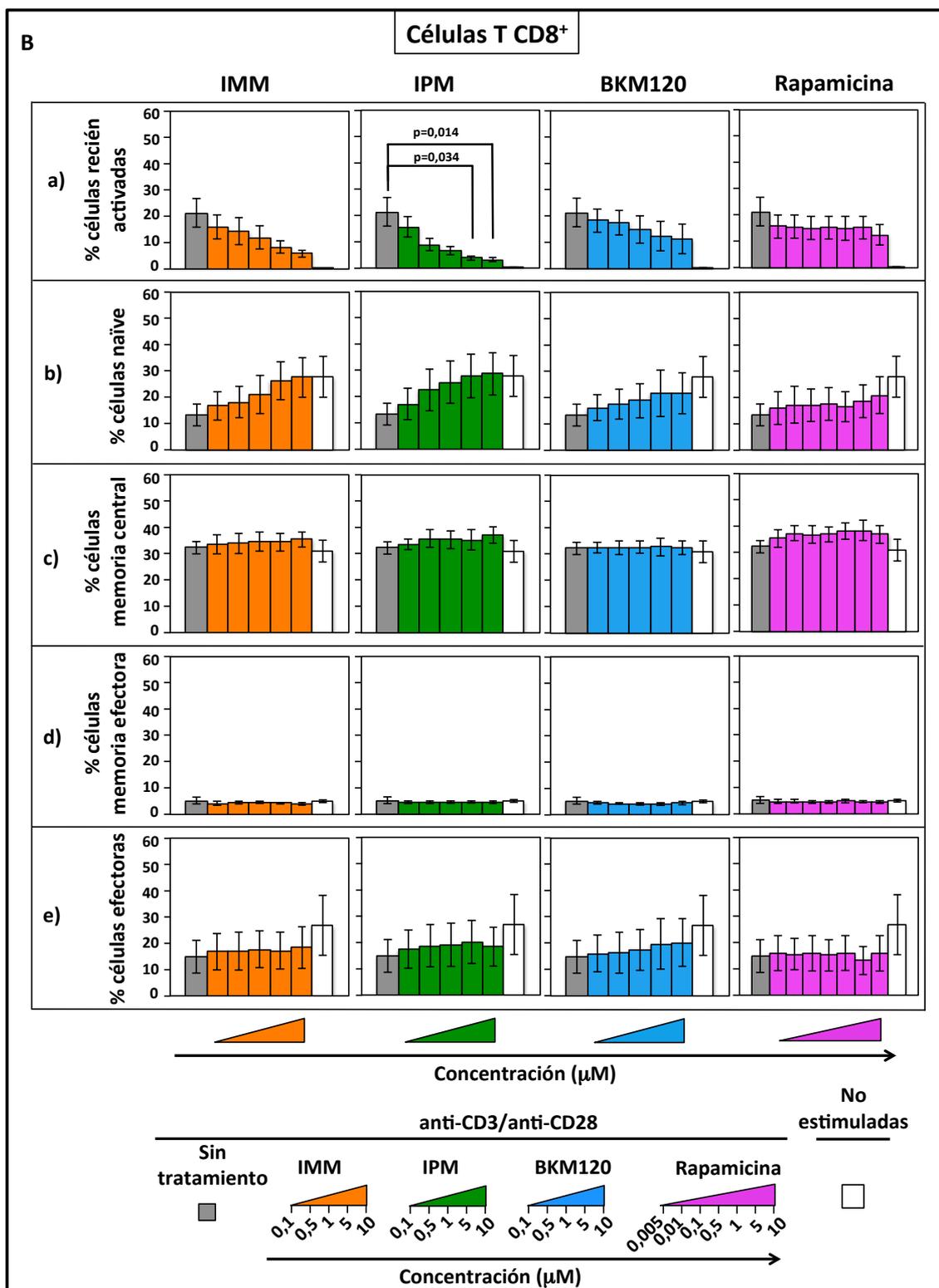
**17. Efecto de IMM, IPM, BKM120 y rapamicina en la expresión de marcadores de activación de linfocitos T:** Porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que expresan IFN- $\gamma$  (**A**), granzima B (**B**) y CD25 (**C**). **D**) Mediana de la intensidad de fluorescencia (MIF) de CD25 en las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Resultados de 5 experimentos independientes.

Por otra parte, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se clasificaron en 5 subpoblaciones en función de la expresión de CD27 y CD45RA:

- células recién activadas (CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>high</sup>),
- células naïve (CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>),
- células de memoria central (CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>),
- células de memoria efectora (CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>)
- células efectoras (CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>).

Se analizó el porcentaje de las mismas y su estado de activación. En la figura 18 se muestra el porcentaje de las diferentes subpoblaciones de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en presencia de IMM, IPM, BKM120 y rapamicina. La estimulación incrementó la población de células recién activadas, tanto en células T CD4<sup>+</sup> como en CD8<sup>+</sup>, que descendió de manera dosis-dependiente en presencia de los inhibidores (figuras 18Aa y 18Ba). Por el contrario, el porcentaje de células naïve disminuyó con la estimulación y se recuperó con el tratamiento, especialmente con IMM e IPM (figuras 18Ab y 18Bb). Con respecto al resto de subpoblaciones, en las células CD4<sup>+</sup> el porcentaje de células de memoria central también disminuyó con la estimulación y se recuperó con la adición de los fármacos (figura 18Ac), mientras que el tratamiento prácticamente no tuvo efecto sobre el porcentaje de células efectoras y de memoria efectora (figuras 18Ad y e). En cuanto a las células CD8<sup>+</sup>, los inhibidores apenas modificaron el porcentaje de estas tres subpoblaciones con respecto a las células estimuladas en ausencia de tratamiento (figuras 18Bc, d y e).

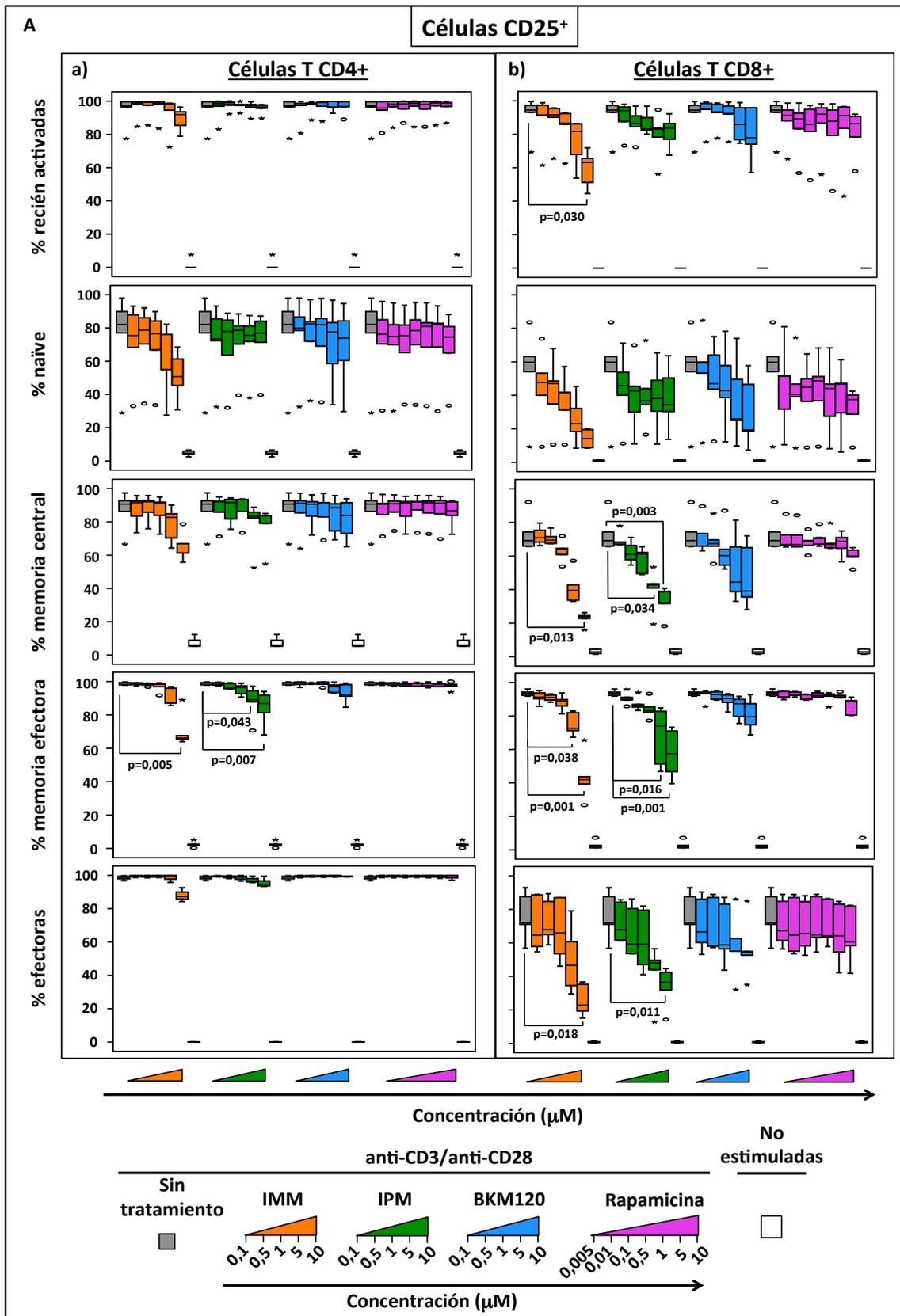


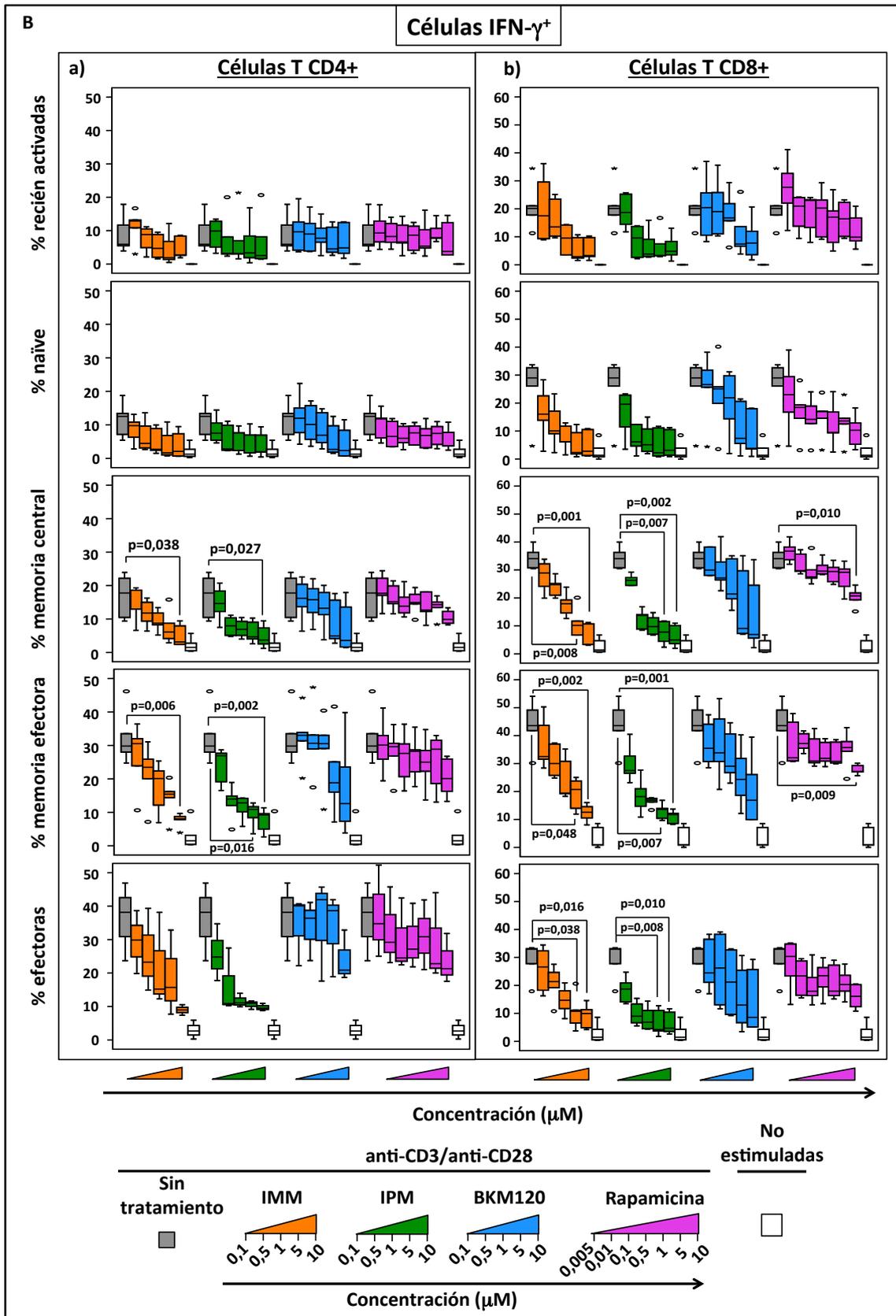


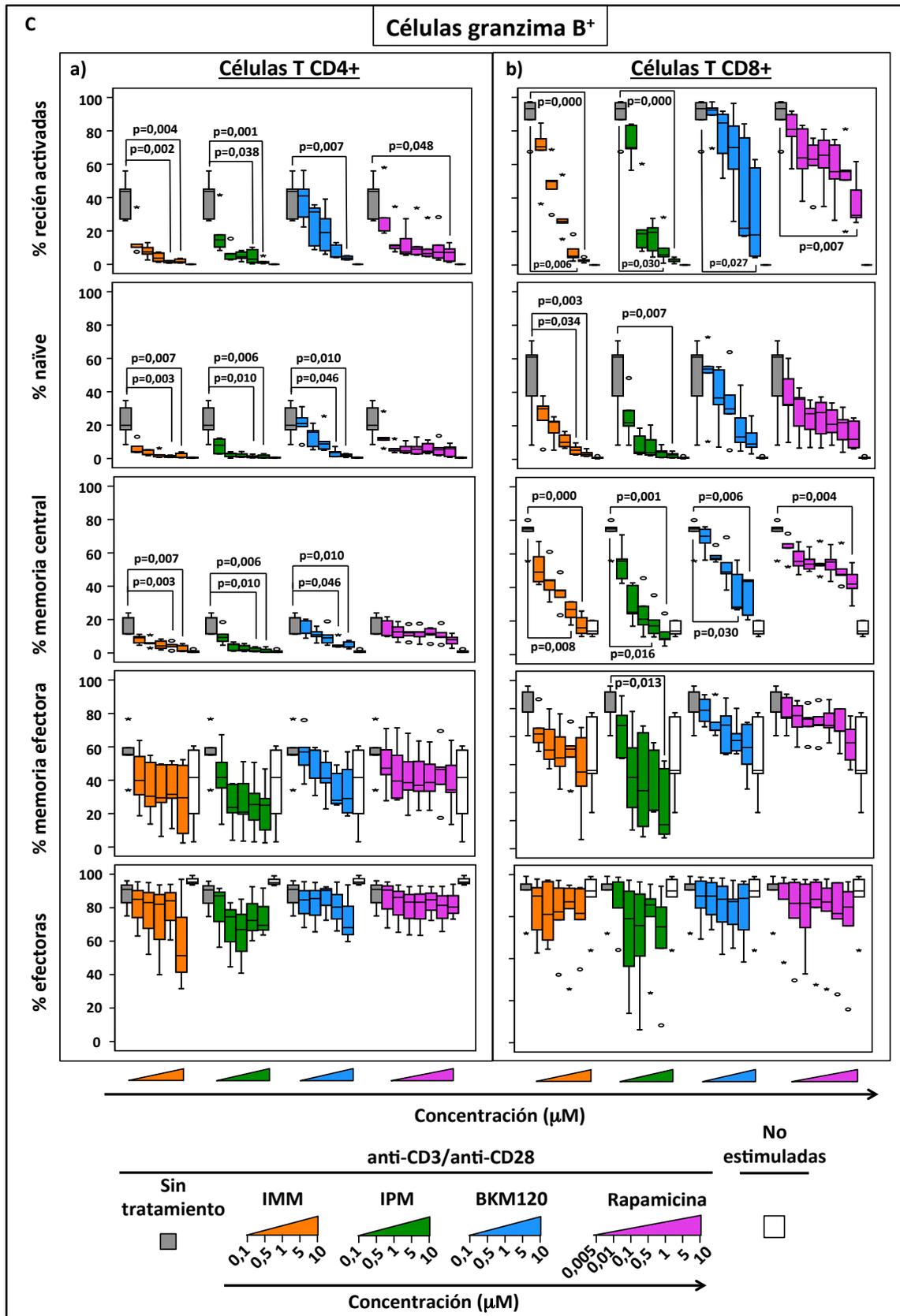
18. Efecto de los inhibidores sobre las distintas subpoblaciones de células T: Porcentaje de células recién activadas, naïve, memoria central, memoria efectora y efectoras, en células T CD4<sup>+</sup> (A) y células T CD8<sup>+</sup> (B). Media  $\pm$  EEM de 5 estudios realizados.

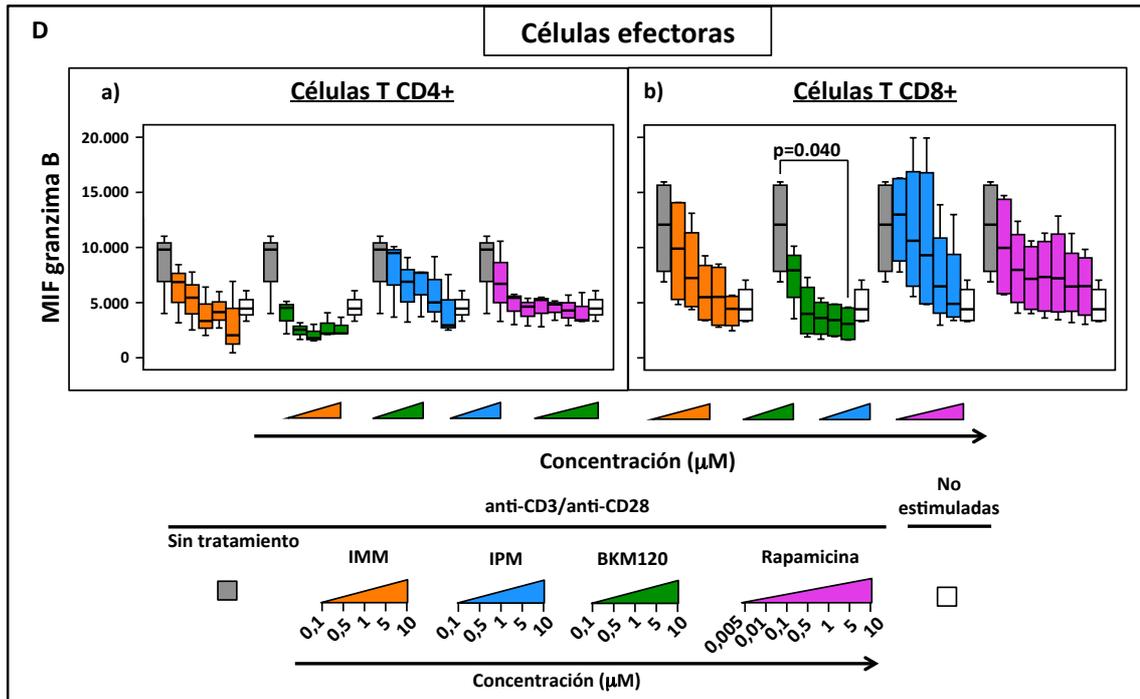
## *Resultados*

Respecto a la expresión de CD25, IFN- $\gamma$  y granzima B se comprobó que, en general, el efecto de los fármacos en las distintas subpoblaciones fue similar al observado en las poblaciones globales CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (figuras 19). Sin embargo, cabe destacar que en las células efectoras el porcentaje de células granzima B<sup>+</sup> se mantuvo elevado a pesar de la adición de los fármacos. No obstante, el tratamiento con los inhibidores sí redujo la MIF del marcador granzima B (figura 19D).





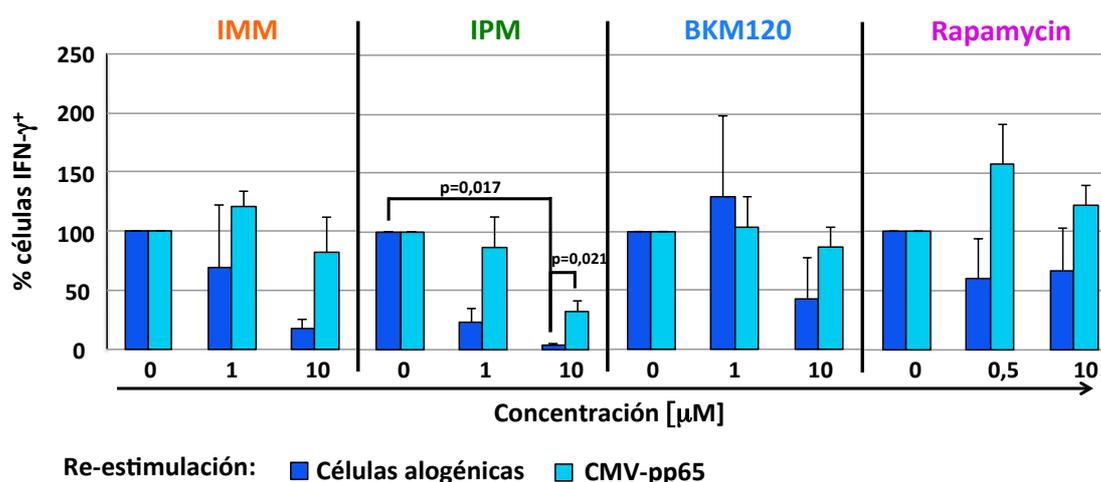




**Figura 19. Efecto de los inhibidores de la ruta PI3K/Akt/mTOR sobre el fenotipo de distintas subpoblaciones de células T. Porcentaje de células que expresan CD25 (A), IFN- $\gamma$  (B) y granzima B (C) en distintas subpoblaciones (recién activadas, naïve, memoria central, memoria efectora y efectoras) de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. D) MIF de granzima B en células T efectoras CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Resultados de 5 experimentos independientes.**

### 7. IMM, IPM, BKM120 y rapamicina inducen tolerancia específica frente a células alogénicas preservando la respuesta frente a patógenos.

Posteriormente, evaluamos si la administración de inhibidores de la ruta PI3K/Akt/mTOR puede generar tolerancia específica de células T alorreactivas, preservando la inmunidad frente a patógenos. Se comprobó que la estimulación alogénica de células T en presencia de los fármacos redujo la respuesta frente a una re-estimulación con los mismos aloantígenos, mientras que el tratamiento no afectó a la capacidad de las células T de activarse frente a CMV (figura 20).



Re-estimulación: ■ Células alogénicas ■ CMV-pp65

**Figura 20. Efecto de los inhibidores en la inducción de tolerancia en células T.** Porcentaje de células secretoras de IFN- $\gamma$  en muestras de linfocitos pre-estimulados con células alogénicas en presencia de diferentes dosis de IMM, IPM, BKM120 o rapamicina y re-estimuladas con las mismas células alogénicas del cultivo inicial o con la proteína de citomegalovirus pp65. Se consideró como 100% el valor de la muestra pre-estimulada en ausencia de fármaco (0 $\mu$ M) y sometida al correspondiente tipo de re-estímulo. Los datos representan la media + EEM de 3 experimentos independientes.

Los compuestos que mantuvieron un balance más favorable entre respuesta frente a CMV y respuesta alogénica fueron IMM e IPM. Así, con IMM 10 $\mu$ M se consigue una respuesta frente a CMV del 81% con respecto a las células sin tratar, mientras que la respuesta frente a las células alogénicas desciende a un 17%. Con IPM 1 $\mu$ M, la respuesta frente a CMV se mantuvo en un 87%, mientras que la respuesta frente a células alogénicas disminuyó a un 22%.

|  | % Respuesta |                    |
|--|-------------|--------------------|
|  | CMV         | Células alogénicas |
| <b>IMM 10 <math>\mu</math>M</b>        | 81          | 17                 |
| <b>IPM 1<math>\mu</math>M</b>          | 87          | 22                 |
| <b>BKM120 10 <math>\mu</math>M</b>     | 86          | 43                 |
| <b>Rapamicina 0,5<math>\mu</math>M</b> | 157         | 60                 |

**Tabla 7. Efecto de los inhibidores en la inducción de tolerancia en células T:** porcentaje de células secretoras de IFN- $\gamma$  en respuesta a la re-estimulación con las células alogénicas o con la proteína CMV-pp65.

## 8. Efecto de IMM e IPM en un modelo murino de EICH aguda.

Finalmente, se analizó *in vivo* la utilidad de IMM e IPM en la profilaxis de la EICH en un modelo murino, utilizando como control rapamicina. El estudio se realizó con 6 grupos de ratones: TBI, MO, EICH, EICH+IMM, EICH+IPM e EICH+rapamicina.

En la figura 21 se observa la supervivencia de los distintos grupos estudiados. La mortalidad del grupo TBI fue del 100% el día 14 postrasplante, mientras que la supervivencia de los ratones que recibieron solo MO y, por tanto, no desarrollaron EICH, fue del 100%. Los ratones con EICH que no recibieron tratamiento tuvieron una mediana de supervivencia de 27 días. La supervivencia de los animales tratados con IMM e IPM fue estadísticamente superior ( $p=0,022$  y  $p=0,002$ , respectivamente), mientras que en el grupo de rapamicina la supervivencia fue del 100%.

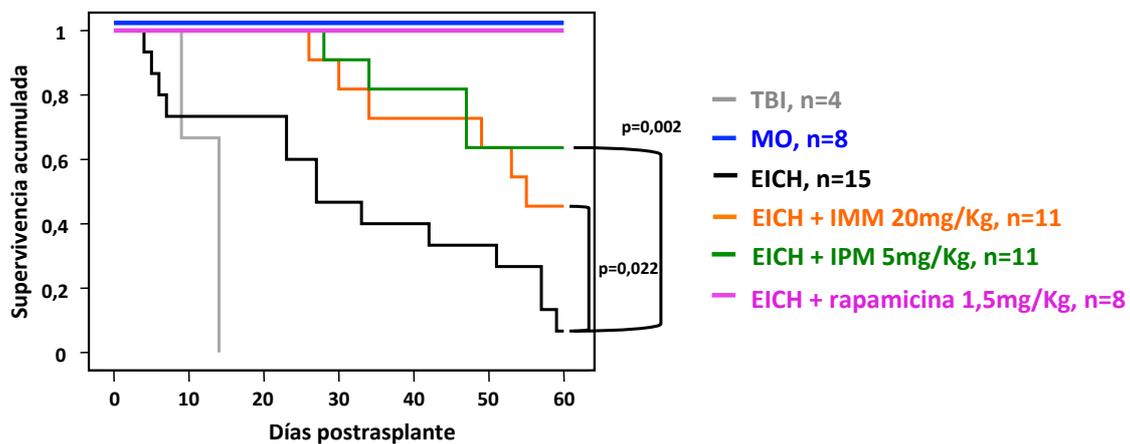
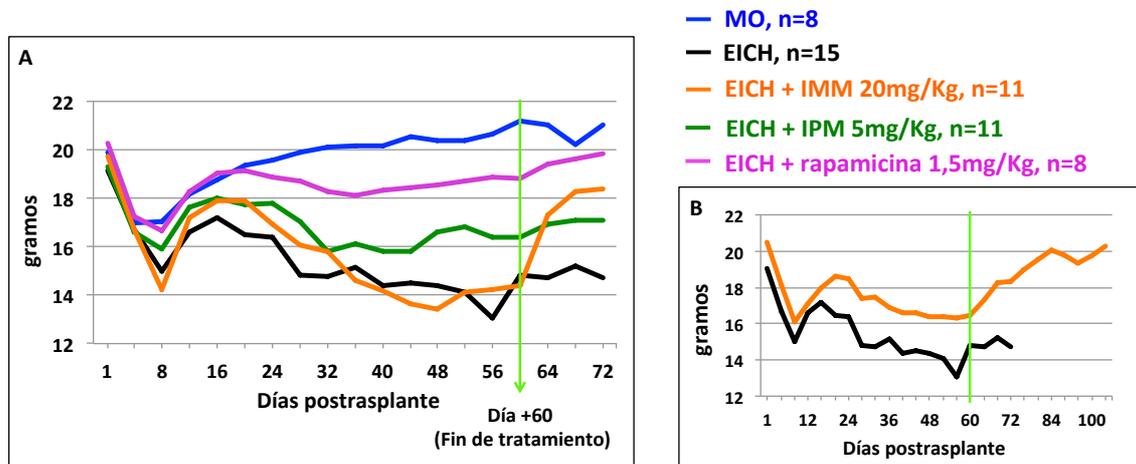


Figura 21. Supervivencia global de los diferentes grupos del estudio en un modelo murino de EICH.

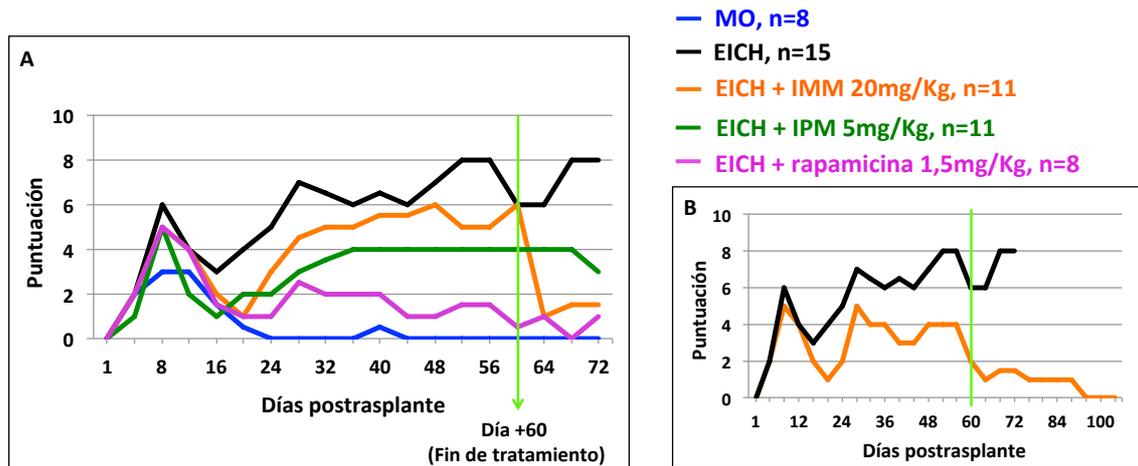
Además de la supervivencia, se analizaron en los ratones diferentes signos de EICH. Todos los grupos sufrieron pérdida de peso como consecuencia de la irradiación e iniciaron su recuperación en torno al día 8 postrasplante. En el grupo de MO la recuperación fue total, mientras que en los ratones con EICH sin tratar el peso volvió a disminuir a partir del día 16 postrasplante. La administración de IPM suavizó esta pérdida de peso, pero fue rapamicina el fármaco que causó un efecto más beneficioso. En los ratones tratados con IMM la mediana de peso fue próxima a la de los ratones sin tratar (figura 22A). Sin embargo, el análisis por separado de los ratones tratados con IMM que sobrevivieron más allá del día 60 postrasplante demuestra que,

en estos animales, la administración de dicho fármaco indujo una mejora del peso (figura 22B).



**Figura 22. Efecto de los fármacos en la variación de peso en un modelo murino de EICH aguda:** Mediana de peso en cada uno de los grupos (A) y comparación de la mediana de peso en los ratones no tratados y en los tratados con IMM que sobrevivieron más allá de los 60 días postrasplante (B).

Además de la pérdida de peso se valoraron otros signos de EICH, como disminución de la actividad, encorvamiento, erizamiento del pelo y aparición de áreas desnudas en la piel, que fueron puntuados con 0, 1 o 2 según su gravedad [143]. La figura 23 refleja el resultado de la suma de estos parámetros para los distintos grupos de ratones trasplantados. Los ratones con EICH sin tratar obtuvieron la mayor puntuación debido a su peor estado físico. El tratamiento con IPM mejoró dicho estado, aunque rapamicina, nuevamente, fue el fármaco más efectivo (figura 23A). En el grupo tratado con IMM, la gravedad de los signos tan solo disminuyó ligeramente con respecto a los ratones sin tratar, aunque, al igual que ocurrió con el peso, se observó que el fármaco sí redujo los signos de EICH en los ratones que sobrevivieron más de 60 días (figura 23B).



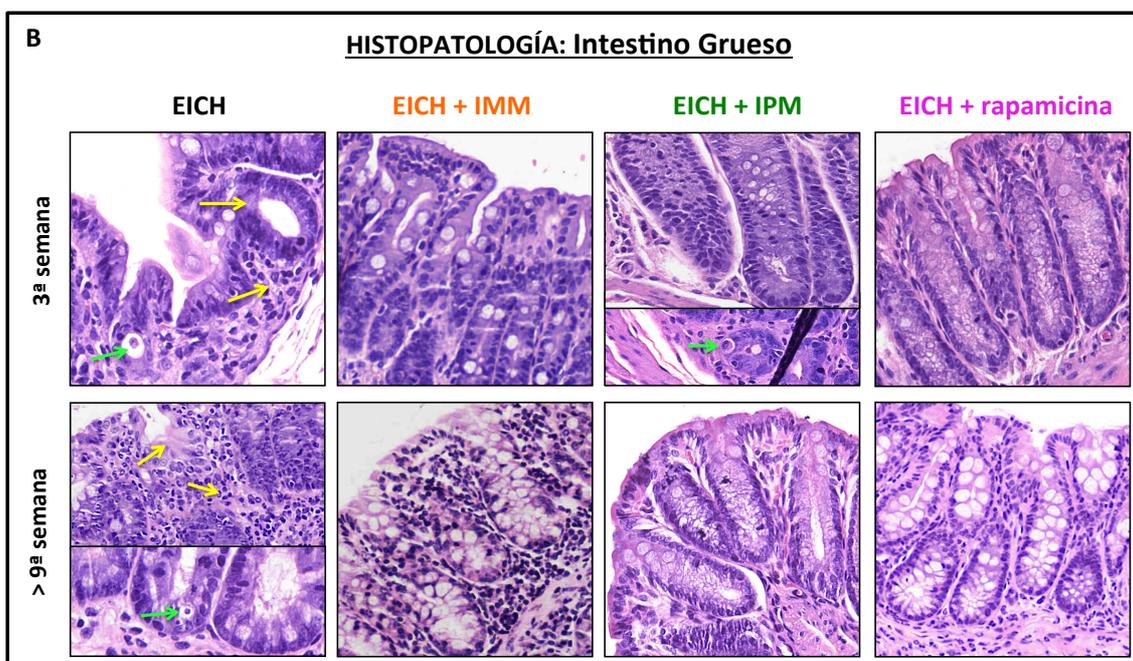
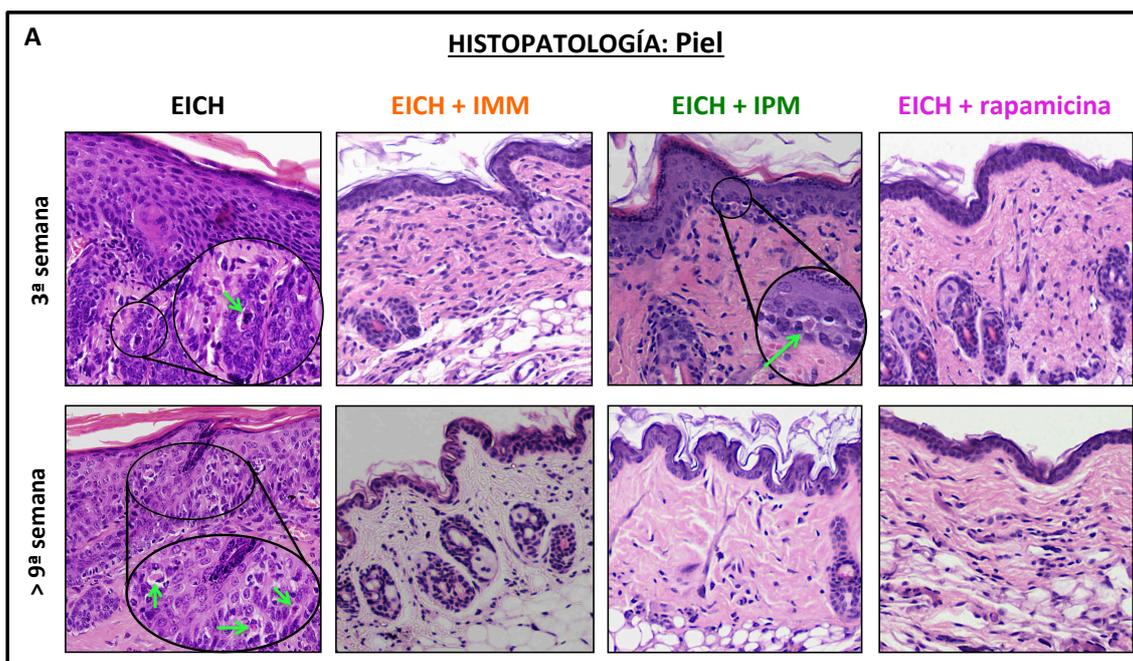
**Figura 23. Efecto de los fármacos en el desarrollo de signos de EICH en un modelo murino:** Mediana de la suma de los parámetros de EICH, evaluados de 0 a 2, **(A)** en los distintos grupos experimentales y **(B)** en los ratones no tratados o en los tratados con IMM que sobrevivieron más allá de los 60 días posttrasplante.

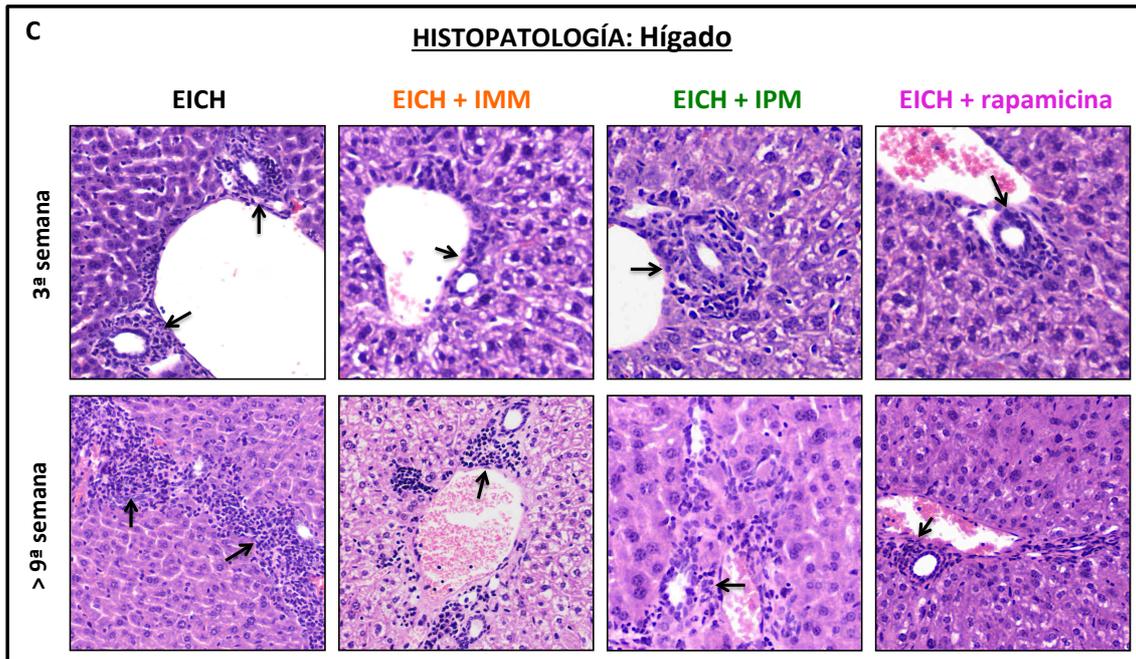
Por último, en uno de los experimentos, se realizaron estudios histopatológicos de piel, hígado e intestino grueso y delgado en un ratón de cada grupo tras 3 y 9 semanas posttrasplante (figura 24).

Después de 3 semanas, el ratón de EICH no tratado presentaba daños en piel, intestino grueso e hígado, clasificados como EICH grado 1, 3 y 1, respectivamente. Los animales tratados con rapamicina e IMM solo presentaron leve infiltración linfocitaria en los espacios periportales (grado 1), mientras que el ratón tratado con IPM mostraba lesiones compatibles con EICH grado 2 en piel y grado 1 en intestino grueso e hígado.

Finalmente, con posterioridad a la semana 9 posttrasplante, el único ratón de EICH no tratado que sobrevivió presentó daños en los tres órganos (piel: grado 2, intestino grueso: grado 1 e hígado: grado 1). Por el contrario, los ratones tratados no presentaron daños en piel e intestino y solo infiltrado linfocitario en espacios periportales (hígado: grado 0,5 – 1).

Respecto al intestino delgado, en ninguno de los ratones evaluados se observaron signos de EICH.





**Figura 24. Estudio histopatológico:** se tomaron muestras de piel (A), intestino grueso (B) e hígado (C) de ratones EICH sin tratar o tratados con IMM, IPM o rapamicina a las 3 y 9 semanas postrasplante. Las muestras fueron procesadas y teñidas con hematoxilina y eosina. En las imágenes se indica la presencia de cuerpos apoptóticos (flechas verdes), pérdida de criptas y células caliciformes en intestino grueso (flechas amarillas) e infiltrado linfocitario en los espacios periportales en hígado (flechas negras).

## **DISCUSIÓN**



En los últimos años, el uso del inhibidor de mTOR rapamicina en la profilaxis y/o tratamiento de la EICH ha proporcionado resultados prometedores [104]. A pesar de ello, la incidencia de esta enfermedad sigue siendo elevada, de modo que un 49% de los pacientes desarrolla EICH aguda grados II-IV y un 50% EICH crónica [109], y se mantiene una alta tasa de recaída [104, 109]. Así mismo, rapamicina y sus derivados (rapalogs) tampoco han cumplido las expectativas generadas en torno a su uso como agentes antitumorales [125, 144, 145]. Se ha postulado que esta efectividad clínica limitada puede deberse a que estos fármacos bloquean de manera incompleta la vía PI3K/Akt/mTOR. Por ello, se han desarrollado nuevos fármacos con el objetivo de inhibir de manera más eficaz dicha ruta [123, 146] y conseguir una mayor actividad anti-neoplásica. Así, se han generado inhibidores que además de bloquear mTORC1, como rapamicina y sus derivados, ejercen su efecto sobre ambos complejos mTORC o sobre PI3K y mTOR simultáneamente. Se ha demostrado que estos fármacos de segunda generación, como IMM e IPM, tienen mayor actividad antineoplásica que rapamicina, pero no existen estudios en los que se haya evaluado si también es superior su capacidad inmunosupresora.

Por ello, en el presente trabajo hemos evaluado el efecto de los fármacos IMM (inhibidor de mTORC1/mTORC2) e IPM (inhibidor de PI3K/ mTORC1/mTORC2) sobre linfocitos T humanos, con el fin de valorar su utilidad en la profilaxis/tratamiento de la EICH. Así mismo, hemos contrastado el efecto de estos inhibidores, que actúan a distintos niveles de la ruta PI3K/Akt/mTOR, con el inhibidor de mTORC1 rapamicina y el inhibidor de PI3K BKM120.

Inicialmente verificamos su capacidad de inhibir la fosforilación de proteínas de la ruta PI3K/Akt/mTOR. En primer lugar estudiamos su efecto sobre mTORC1. Comprobamos que IMM e IPM, al igual que BKM120, inhibieron la fosforilación de sus dianas 4E-BP1, p70S6K y rpS6, como se ha descrito previamente en células tumorales [137, 138]. Sin embargo, rapamicina inhibió por completo la fosforilación de rpS6, pero redujo solo parcialmente la fosforilación de 4E-BP1, corroborando los estudios previos que describen la refractariedad de esta fosforilación a la acción del fármaco [127-129].

Por otra parte, observamos que en presencia de los fármacos no solo disminuyó la fosforilación de rpS6 y 4E-BP1, sino también su expresión. Se ha descrito que la síntesis de proteínas ribosomales, como rpS6, es dependiente del ciclo celular, manteniéndose bajos niveles de expresión en fase  $G_0G_1$  [147, 148]. De hecho, en las células T en reposo, se observa una baja expresión de rpS6. Por tanto, es probable que el efecto antiproliferativo que ejercen los fármacos sobre las células T estimuladas disminuya los niveles de expresión de esta proteína. Respecto a 4E-BP1, su expresión

está regulada de manera negativa por el factor de transcripción Egr-1 a través de las rutas MAPK/ERK y p38 MAPK [149], ambas activas en células T estimuladas. Se ha comprobado que tanto la inhibición de mTORC1 como de PI3K incrementan la señalización de la vía RAS/MEK/ERK, como indica el aumento de pERK en células tumorales tratadas con inhibidores tanto de PI3K como de mTOR. Por tanto, la actividad de las rutas MAPK puede incrementar con la inhibición de PI3K/Akt/mTOR, dando lugar a la disminución de la expresión de 4E-BP1.

Respecto a la actividad de mTORC2, IMM e IPM bloquearon su señalización, lo que se deduce de la disminución de los niveles de Akt fosforilada en el residuo S473. El inhibidor de PI3K BKM120 también inhibió dicha fosforilación, como se ha observado en líneas tumorales [130, 131, 133], apoyando la hipótesis de que mTORC2 se activa por la vía de PI3K [65, 66, 150]. En cuanto a rapamicina, algunos estudios han descrito que, en ciertas células y bajo un tratamiento determinado, puede inhibir la actividad del complejo mTORC2 [102, 151]. Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, rapamicina no inhibió la fosforilación de Akt S473, la cual incluso incrementó. El aumento de Akt fosforilada, tanto en S473 como en T308, por efecto de la inhibición de mTORC1 se ha descrito anteriormente [126, 152]. Probablemente se debe a que la inhibición de mTORC1 por rapamicina anula los *feedbacks* negativos que mTORC1 y p70S6K ejercen sobre mTORC2 y PI3K [71-75], dando lugar al incremento en la fosforilación de sus respectivas dianas, Akt S473 y Akt T308 (figura 25). En concordancia, rapamicina e IMM, al actuar únicamente sobre mTOR, no solo no redujeron la fosforilación de Akt T308, dependiente de PI3K, sino que, a determinadas concentraciones, indujeron un incremento. Por el contrario, los inhibidores de PI3K, IPM y BKM120 inhibieron de manera efectiva la fosforilación de Akt T308 (figura 25).

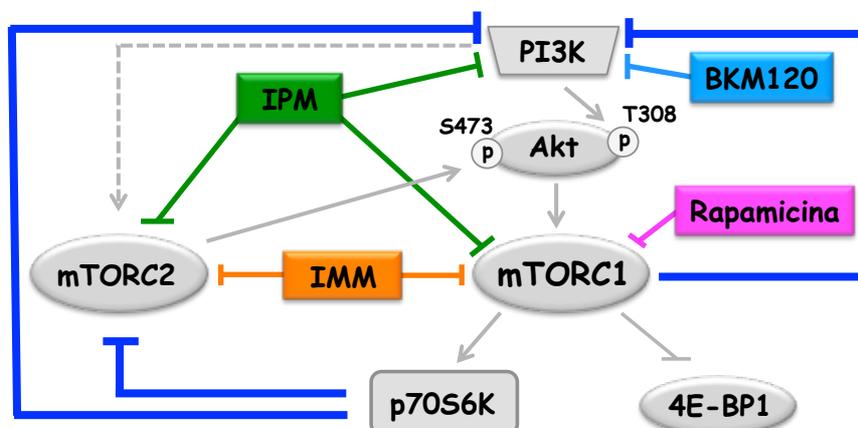


Figura 25. Niveles a los que actúan los inhibidores de la vía PI3K/Akt/mTOR y los *feedbacks* negativos de la ruta.

Estas observaciones se correlacionan con los resultados obtenidos en los estudios de proliferación y ciclo celular, en los que el efecto antiproliferativo de rapamicina fue evidente a dosis bajas, pero a altas concentraciones la efectividad de los otros inhibidores fue superior. Es posible que la acción de rapamicina sobre la fosforilación de rpS6, fundamental en la progresión del ciclo celular [63], permita al fármaco disminuir la proliferación. Sin embargo, el mantenimiento de la actividad de 4E-BP1 y Akt, claves también en la síntesis y activación de proteínas del ciclo celular [52, 61, 62], podría explicar por qué las células T pueden escapar al efecto inhibitorio de la rapamicina sobre la proliferación, como se ha argumentado en otros estudios [153-155]. Así pues, confirmamos que IMM e IPM, al igual que BKM120, no solo inhiben la proliferación de células tumorales, sino que también afectan a la proliferación de células T estimuladas con AcMo anti-CD3 y anti-CD28.

Otra de las características descritas sobre los fármacos de segunda generación es su capacidad de inducir apoptosis en numerosas líneas tumorales [123]. Por el contrario, no inducen apoptosis de manera significativa en células T en reposo. Más aún, en células T estimuladas, el tratamiento con los inhibidores causó una ligera disminución de la unión de anexina V y de caspasa 3 activada. Estas observaciones, que indicarían que los inhibidores de mTOR reducen la apoptosis en células T estimuladas, pueden explicarse desde varias perspectivas. En primer lugar, dado que los inhibidores de mTOR previenen la activación de las células T, probablemente también previenen la muerte celular inducida por activación, como se ha sugerido previamente [154]. Además, la exposición de fosfatidilserina en la superficie celular, que permite la unión de anexina V, y la activación de caspasa 3 se producen en linfocitos T activados en ausencia de apoptosis, como parte del proceso de activación de la célula T [156-160]. Por tanto, la inhibición de la activación de la célula T ejercida por los fármacos conllevaría un descenso de la externalización de fosfatidilserina y de la activación de caspasa 3, como observamos en nuestros estudios. En cualquier caso, ninguno de los fármacos parece inducir apoptosis en células T de manera significativa, pues en ese caso ambos parámetros aumentarían de manera inequívoca.

Dado que Akt desempeña un papel crítico en la inducción de supervivencia [52], podríamos esperar que los fármacos que inhiben la fosforilación de esta quinasa incrementaran la apoptosis. En el caso de IMM, es posible que la fosforilación en T308 sea suficiente para mantener la supervivencia inducida por Akt. O quizás, otras proteínas activadas tras la estimulación de las células T e involucradas en la inhibición de apoptosis, como NF- $\kappa$ B [161], compensen la pérdida de actividad de Akt. Este

argumento sería también aplicable al efecto de BKM120 e IPM, que inhiben la fosforilación de Akt tanto en S473 como en T308. En línea con nuestros resultados, algunos autores han confirmado que ambos inhibidores ejercen un efecto limitado sobre la viabilidad de CMNs normales. Con respecto a rapamicina, la observación de que no induce apoptosis es menos sorprendente, puesto que no inhibe la fosforilación de Akt. De hecho, aunque en algunas condiciones se ha descrito que rapamicina puede inducir la apoptosis de células T [162, 163], también se ha demostrado la resistencia de linfocitos T tratados con rapamicina a la muerte celular, asociada a la regulación de proteínas pro- y anti-apoptóticas [154, 164, 165].

Diversos estudios destacan la importancia de la ruta PI3K/Akt/mTOR en la activación y diferenciación de las células T, pues regula la expresión de factores de transcripción que determinan la respuesta final de la célula [47, 48, 166]. Por ello, examinamos la acción de los fármacos sobre la secreción de citoquinas (Th1 y Th2) y la expresión de marcadores de activación como CD25, IFN- $\gamma$  y granzima B.

El análisis de secreción de citoquinas mostró que los cuatro fármacos, en general, inhiben de manera similar la secreción de las citoquinas evaluadas. En concordancia con nuestros resultados, otros estudios han confirmado que rapamicina inhibe la secreción tanto de IL-2 como de otras citoquinas Th1 y Th2 en células T [167-169]. Esto es lógico, puesto que mTOR regula la expresión de factores de transcripción como T-bet y GATA-3, que modulan la síntesis de citoquinas Th1 y Th2, respectivamente, y dirigen la diferenciación hacia uno u otro subtipo celular [86-88, 151, 170]. Así, los fármacos podrían afectar a la diferenciación y actividad de las células Th1 y Th2, implicadas en el desarrollo de la EICH [22, 27, 28]. A pesar de ello, destaca el incremento causado por IPM sobre la secreción de IL-2 a dosis intermedias-altas del fármaco, tras inducir su descenso a dosis bajas. Una posible razón sería que, debido a la disminución de los niveles de CD25 (cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2) en la membrana, la citoquina no podría unirse a su receptor e internalizarse, por lo que incrementaría en el sobrenadante. Sin embargo, el tratamiento con IMM también causa una disminución de la expresión de CD25 que no va acompañada del incremento de IL-2. Otra posible explicación sería que la fuerte inhibición ejercida por IPM sobre PI3K y mTOR conduciría a la activación, con mayor intensidad, de otras vías que promueven la síntesis de IL-2 como Ca<sup>2+</sup>/calcineurina/NFAT, Ras o NF- $\kappa$ B. Por ejemplo, la alta producción inicial de IL-2 tras la estimulación de la célula T va seguida de su disminución. T-bet, diana de

mTOR, es imprescindible para que se produzca esta represión de la síntesis de IL-2, mediante la inhibición de la actividad de NF- $\kappa$ B y NFAT [171, 172]. Así pues, la fuerte inhibición ejercida por IPM sobre mTORC1 iría asociada a la pérdida de expresión de T-bet [86] y, por tanto, de su actividad supresora sobre NF- $\kappa$ B y NFAT, incrementando la secreción de IL-2. Diversos estudios han mostrado que la administración de IL-2 incrementa el número de células Treg, lo que se asocia a una disminución de la severidad de la EICH [173-175]. Por ello, una de las posibles ventajas que podría ofrecer IPM al mantener los niveles de IL-2, sería el favorecer la generación de células Treg.

Respecto a la expresión de CD25, los fármacos disminuyeron en mayor o menor medida la expresión de este marcador. La síntesis de ARNm de CD25 se induce a través de diferentes rutas de señalización, dependiendo del estímulo. Así, se ha descrito que rapamicina reduce su expresión en células T estimuladas con anti-CD3, pero no en las estimuladas con forbol miristato acetato (PMA, phorbol myristate acetate) [176]. PMA mimetiza la actividad del diacilglicerol (DAG), activando directamente a la quinasa PKC, que a su vez induce la expresión de CD25. Por otra parte, la correcta activación de PKC tras la estimulación a través del TCR requiere la señal proporcionada por CD28 [177]. Relacionando estos datos, podríamos inferir que en ausencia de la señal proporcionada por CD28, la expresión de CD25 inducida a través de CD3 dependería de mTORC1, de modo que es inhibida por rapamicina. Sin embargo, la co-estimulación con anti-CD28, induce una eficiente activación de PKC, presumiblemente mediada por mTORC2, que apenas es inhibida por rapamicina. Esto explicaría por qué los fármacos que inhiben mTORC2 reducen de manera más eficaz la expresión de CD25. En cualquier caso, la activación de PKC por DAG seguiría activa, lo que justificaría que la disminución de CD25 no sea más acusada (figura 26).

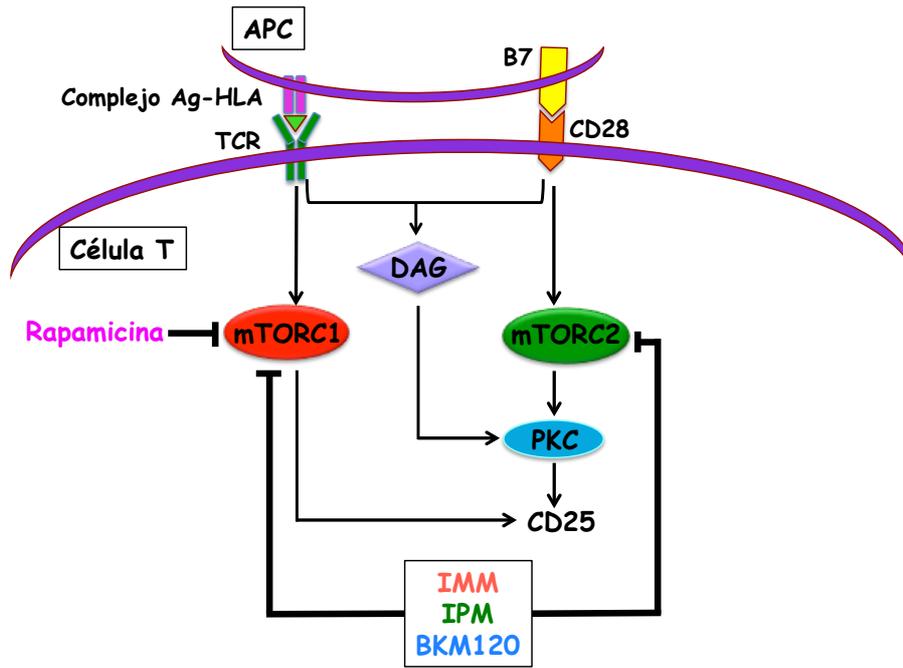


Figura 26. Posible acción de los inhibidores sobre la expresión de CD25.

Los datos de expresión de CD25 se correlacionan con los de proliferación. Así, en las muestras tratadas con rapamicina, los mayores niveles de CD25 permitirían la transducción de la señal mitogénica proporcionada por la IL-2, importante en la progresión del ciclo celular [85].

En cuanto al análisis de la expresión de IFN- $\gamma$  intracelular, los resultados obtenidos se corresponden con los de IFN- $\gamma$  secretado. Es decir, comprobamos que disminuye en presencia de los fármacos, tanto en células T CD4<sup>+</sup> como en CD8<sup>+</sup>. De igual modo ocurrió con la expresión de granzima B. La reducción de ambos marcadores es lógica, pues su expresión depende de activadores transcripcionales como T-bet y EOMES [178-180], que están regulados por la ruta PI3K/Akt/mTOR [95]. El descenso de IFN- $\gamma$  y granzima B se ha observado en presencia de rapamicina, tanto *in vitro* [86, 181, 182] como en un modelo murino de EICH [106]. En nuestro estudio observamos que IMM e IPM, disminuyeron la expresión de ambas moléculas de manera más efectiva que rapamicina. Esta reducción de granzima B sería importante para inhibir la activación de células T citotóxicas, principales responsables del daño tisular ocasionado en la EICH [7].

Las células T constituyen una población heterogénea y dentro de las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se distinguen distintas subpoblaciones funcionales que, a su vez, pueden

subdividirse en diferentes poblaciones o estadios madurativos de acuerdo con su patrón de expresión de CD27 y CD45RA. Por ello, analizamos el efecto de los inhibidores de PI3K/Akt/mTOR sobre distintas subpoblaciones. En primer lugar observamos que los fármacos, especialmente IMM e IPM, inducen una disminución del porcentaje de células T “recién activadas” (CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>high</sup>) tras la estimulación, con el consecuente incremento del porcentaje de células *naïve* (CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) de las que proceden [183]. Además, comprobamos que, en general, la expresión de marcadores de activación en ambas poblaciones disminuye con los fármacos. Esto sería de vital importancia en el contexto de trasplante alogénico, pues el amplio repertorio de TCRs en células *naïve* [184], así como su gran capacidad para migrar a nódulos linfáticos, proliferar y diferenciarse tras su estimulación [185, 186], les confiere un papel destacado en el desarrollo de la EICH, como se ha comprobado en modelos murinos [185-187]. Así, IMM e IPM podrían controlar la activación y expansión de células T *naïve* alorreactivas y su diferenciación hacia células efectoras y de memoria (T<sub>ME</sub> y T<sub>MC</sub>), proceso en el que, recordemos, la ruta PI3K/Akt/mTOR es fundamental [86-88, 95].

En cuanto a la expresión de marcadores de activación en el resto de las subpoblaciones, que disminuye en líneas generales, destaca el alto porcentaje de células granzima B<sup>+</sup> en las células efectoras tratadas. Sin embargo, como sugiere el análisis de la MIF, los fármacos disminuirían la síntesis de *novoo* de granzima B, pero no afectarían a las moléculas ya sintetizadas que expresan prácticamente todas las células efectoras, incluso en ausencia de estimulación/en reposo.

Una estrategia de profilaxis de EICH debería cumplir dos características fundamentales. La primera, es la inducción de tolerancia frente a los aloantígenos. Es decir, que los fármacos protejan frente a la activación de las células del donante no solo durante el periodo de tratamiento, sino que se genere una protección a largo plazo. La segunda, que se mantenga una adecuada respuesta frente a las infecciones. Desafortunadamente, las estrategias de profilaxis de EICH están asociadas a un alto riesgo de infecciones por patógenos, tales como citomegalovirus (CMV). De hecho, la infección por CMV constituye una de las complicaciones más importantes tras el alo-TPH [188]. Respecto a la inducción de tolerancia, diversos estudios han confirmado, tanto *in vitro* como *in vivo*, que el tratamiento con rapamicina en el momento de la estimulación induce anergia de células T CD4<sup>+</sup> [76-78, 189]. Por otra parte, se ha sugerido que la inclusión de rapamicina en el régimen profiláctico para la EICH podría

facilitar la reconstitución inmune de linfocitos CMV-específicos, pues está asociada a una reducción significativa de la reactivación del virus [190]. De hecho, a pesar de la actividad inmunosupresora de la rapamicina, se ha demostrado que también ejerce efectos inmunoestimuladores. Así, su administración en modelos animales de infección vírica o vacunación, favorece la generación de células T CD8<sup>+</sup> de memoria específicas de antígeno [92, 96].

Por todo ello, evaluamos si los inhibidores de PI3K/Akt/mTOR utilizados en el estudio permitían inducir tolerancia frente a células alogénicas a la vez que mantenían una actividad eficaz frente a un estímulo procedente de un patógeno, como la proteína de CMV pp65. Observamos que la adición de los inhibidores a cultivos estimulados con células alogénicas provoca la disminución de la reactividad frente a las células alogénicas, al tiempo que se preserva una respuesta eficaz frente a CMV, que incluso incrementa con IMM y rapamicina a determinadas concentraciones. En nuestro diseño experimental, la corta duración de los cultivos no permite la generación de células de memoria, por lo que probablemente los resultados reflejan la intensificación de la respuesta de células de memoria ya existentes frente a CMV. Sin embargo, el análisis de la expresión de marcadores de activación en células de memoria mostró que los inhibidores de mTOR no incrementaron, sino que disminuyeron la respuesta de células de memoria, incluida la producción de IFN- $\gamma$ . El hecho de que en estos estudios se haya utilizado una estimulación policlonal (con anti-CD3/anti-CD28) nos conduce a pensar que, quizá, la inhibición de mTOR ejerce un efecto inmunoestimulador sobre células que no están siendo estimuladas en el momento de la adición del fármaco y que les ofrece una ventaja para una estimulación posterior. De hecho, en los estudios en modelos animales en los que se observa efecto inmunoestimulador de rapamicina sobre la generación de células de memoria [92, 96], administran el fármaco con anterioridad a la estimulación con el agente infeccioso o a los 8 días post-infección [92]. Por ello, postulamos que la administración de rapamicina en el momento de la estimulación tiene un efecto inmunosupresor, mientras que su administración previa o posterior a la estimulación refuerza la respuesta de memoria. Por tanto, los datos publicados al respecto sugieren, en conjunto, que la inhibición de mTOR puede resultar en anergia o promover la activación/diferenciación de la célula T, dependiendo del momento de administración.

Finalmente, estudiamos la eficacia de IMM e IPM para prevenir el desarrollo de la EICH en un modelo *in vivo*, empleando como control de profilaxis rapamicina. Estudios previos en modelos murinos han demostrado que rapamicina inhibe la actividad citotóxica de las células del donante, induce la generación/expansión de células Treg

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> y, en definitiva, reduce significativamente el desarrollo de EICH [106, 173, 191, 192].

Los estudios *in vitro*, en los que IMM e IPM inhiben la activación de las células T de manera más eficaz que rapamicina, sugieren que ambos fármacos podrían tener utilidad en la inhibición de la EICH. Respecto a los estudios histopatológicos, comprobamos que tanto IMM como IPM redujeron, al igual que rapamicina, los daños tisulares característicos de la EICH. Además, aumentaron la supervivencia de manera significativa y redujeron los signos de la enfermedad. Sin embargo, rapamicina mejoró la supervivencia de los ratones y su estado físico de manera más efectiva. El uso de inhibidores de la vía PI3K/Akt/mTOR está asociado a ciertas alteraciones metabólicas y daños neuronales, epiteliales, gastrointestinales, etc [193]. Por ello, es posible que IMM e IPM, al bloquear esta vía de señalización con mayor eficacia que rapamicina, tengan mayor efecto tóxico. Esto sugiere la conveniencia de ampliar los estudios animales con el fin de definir la dosis idónea que, controlando la EICH, disminuyera la toxicidad y por tanto la morbi-mortalidad.

Por otra parte, una posible ventaja del uso de IMM e IPM sería su alto potencial antineoplásico frente a hemopatías malignas, que, de ser superior al de rapamicina, podría reducir con mayor eficacia la incidencia de recaídas. Por ello, sería interesante comparar el efecto antineoplásico de estos fármacos tanto *in vitro* como *in vivo*. Por otra parte, diversos estudios sugieren que para generar/expandir Treg, cuya potencial utilidad en la inhibición de la EICH ha sido descrita [29-31, 194], es necesario inhibir ambos complejos mTORC [86, 88]. Por ello, también sería conveniente determinar el efecto de IMM e IPM sobre la población de Treg.

En definitiva, IMM e IPM ejercen un papel inmunosupresor en células T estimuladas, inducen tolerancia sobre células alogénicas manteniendo la respuesta frente a patógenos y reducen la severidad y mortalidad de la EICH en un modelo murino. Por lo que estos resultados avalan su posible utilidad en el contexto del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.



**CONCLUSIONES**



1. Respecto al efecto *in vitro* de IMM, IPM, BKM120 y rapamicina sobre la activación, proliferación y supervivencia de las células T humanas:

1.1 Los fármacos bloquean, en células T, la ruta de activación PI3K/Akt/mTOR.

1.2 Todos ellos inhiben la proliferación linfocitaria, al bloquear el ciclo celular en fase G<sub>0</sub>G<sub>1</sub>, sin afectar la viabilidad celular.

1.3 Los inhibidores reducen la activación de células T, pues disminuyen la secreción de citoquinas Th1/Th2 y la expresión de marcadores de activación como CD25, IFN- $\gamma$  y granzima B.

1.4 Los fármacos más efectivos fueron IMM e IPM.

2. Respecto a la capacidad de los fármacos para inducir tolerancia específica frente a células alogénicas preservando la respuesta frente a patógenos: IMM e IPM reducen, de manera más efectiva que rapamicina y BKM120, la reactividad frente a células alogénicas manteniendo una respuesta eficaz frente a citomegalovirus.

3. Respecto a la utilidad de IMM e IPM en la profilaxis de la EICH en un modelo murino: la administración de IMM e IPM disminuye el daño tisular ocasionado por la EICH de manera similar a rapamicina y mejora significativamente la supervivencia con respecto a los ratones no tratados. Sin embargo, no alcanzan la tasa de supervivencia lograda con rapamicina, lo que sugiere que, a las concentraciones utilizadas, IMM e IPM pueden ejercer mayor toxicidad.



# **BIBLIOGRAFÍA**



1. Qian, L., Z. Wu, and J. Shen, *Advances in the treatment of acute graft-versus-host disease*. J Cell Mol Med, 2013. **17**(8): p. 966-75.
2. Heidegger, S., et al., *The role of pattern-recognition receptors in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia after allogeneic stem cell transplantation*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 337.
3. Pavletic, S.Z. and D.H. Fowler, *Are we making progress in GVHD prophylaxis and treatment?* Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2012. **2012**: p. 251-64.
4. Lake, R.A. and B.W. Robinson, *Immunotherapy and chemotherapy--a practical partnership*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(5): p. 397-405.
5. Filipovich, A.H., et al., *National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report*. Biol Blood Marrow Transplant, 2005. **11**(12): p. 945-56.
6. Jagasia, M., et al., *Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation*. Blood, 2012. **119**(1): p. 296-307.
7. Ferrara, J.L., et al., *Graft-versus-host disease*. Lancet, 2009. **373**(9674): p. 1550-61.
8. Garnett, C., J.F. Apperley, and J. Pavlu, *Treatment and management of graft-versus-host disease: improving response and survival*. Ther Adv Hematol, 2013. **4**(6): p. 366-78.
9. Schroeder, M.A. and J.F. DiPersio, *Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations*. Dis Model Mech, 2011. **4**(3): p. 318-33.
10. Toubai, T., Y. Sun, and P. Reddy, *GVHD pathophysiology: is acute different from chronic?* Best Pract Res Clin Haematol, 2008. **21**(2): p. 101-17.
11. Morris, S.C., et al., *Allotype-specific immunoregulation of autoantibody production by host B cells in chronic graft-versus host disease*. J Immunol, 1990. **144**(3): p. 916-22.
12. Loiseau, P., et al., *HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival*. Biol Blood Marrow Transplant, 2007. **13**(8): p. 965-74.
13. Goulmy, E., et al., *Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation*. N Engl J Med, 1996. **334**(5): p. 281-5.
14. Markey, K.A., K.P. MacDonald, and G.R. Hill, *Impact of cytokine gene polymorphisms on graft-vs-host disease*. Tissue Antigens, 2008. **72**(6): p. 507-16.
15. Chen, C. and S.L. Huang, *Killer cell inhibitory receptors involved in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation - review*. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2004. **12**(2): p. 236-43.
16. Holler, E., et al., *Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation*. Blood, 2004. **104**(3): p. 889-94.
17. Perez-Garcia, A., et al., *CTLA-4 polymorphisms and clinical outcome after allogeneic stem cell transplantation from HLA-identical sibling donors*. Blood, 2007. **110**(1): p. 461-7.

18. van den Brink, M.R. and S.J. Burakoff, *Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(4): p. 273-81.
19. Braun, M.Y., et al., *Cytotoxic T cells deficient in both functional fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus-host disease*. J Exp Med, 1996. **183**(2): p. 657-61.
20. Graubert, T.A., et al., *Perforin/granzyme-dependent and independent mechanisms are both important for the development of graft-versus-host disease after murine bone marrow transplantation*. J Clin Invest, 1997. **100**(4): p. 904-11.
21. Hattori, K., et al., *Differential effects of anti-Fas ligand and anti-tumor necrosis factor alpha antibodies on acute graft-versus-host disease pathologies*. Blood, 1998. **91**(11): p. 4051-5.
22. Fu, J., J. Heinrichs, and X.Z. Yu, *Helper T-cell differentiation in graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2014. **62**(4): p. 277-301.
23. Bedoya, S.K., et al., *Th17 cells in immunity and autoimmunity*. Clin Dev Immunol, 2013. **2013**: p. 986789.
24. Zhu, J. and W.E. Paul, *CD4 T cells: fates, functions, and faults*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1557-69.
25. Carlson, M.J., et al., *In vitro-differentiated TH17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations*. Blood, 2009. **113**(6): p. 1365-74.
26. Iclozan, C., et al., *T helper17 cells are sufficient but not necessary to induce acute graft-versus-host disease*. Biol Blood Marrow Transplant, 2010. **16**(2): p. 170-8.
27. Nikolic, B., et al., *Th1 and Th2 mediate acute graft-versus-host disease, each with distinct end-organ targets*. J Clin Invest, 2000. **105**(9): p. 1289-98.
28. Nishimori, H., Y. Maeda, and M. Tanimoto, *Chronic graft-versus-host disease: disease biology and novel therapeutic strategies*. Acta Med Okayama, 2013. **67**(1): p. 1-8.
29. Hess, A.D., *Modulation of graft-versus-host disease: role of regulatory T lymphocytes*. Biol Blood Marrow Transplant, 2006. **12**(1 Suppl 2): p. 13-21.
30. Xie, Y.H., et al., *[Combination of dexamethasone with IL-2 selectively induces the expansion of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in vivo and suppresses graft versus host disease.]*. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi, 2009. **30**(11): p. 726-30.
31. Brunstein, C.G., et al., *Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics*. Blood, 2011. **117**(3): p. 1061-70.
32. Ratanatharathorn, V., et al., *Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation*. Blood, 1998. **92**(7): p. 2303-14.
33. Nash, R.A., et al., *Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors*. Blood, 2000. **96**(6): p. 2062-8.

34. Woo, M., et al., *Toxicities of tacrolimus and cyclosporin A after allogeneic blood stem cell transplantation*. Bone Marrow Transplant, 1997. **20**(12): p. 1095-8.
35. Cutler, C., et al., *Mucositis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a cohort study of methotrexate- and non-methotrexate-containing graft-versus-host disease prophylaxis regimens*. Biol Blood Marrow Transplant, 2005. **11**(5): p. 383-8.
36. Hale, G. and H. Waldmann, *Control of graft-versus-host disease and graft rejection by T cell depletion of donor and recipient with Campath-1 antibodies. Results of matched sibling transplants for malignant diseases*. Bone Marrow Transplant, 1994. **13**(5): p. 597-611.
37. Mohty, M., *Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond*. Leukemia, 2007. **21**(7): p. 1387-94.
38. Bolwell, B., et al., *A prospective randomized trial comparing cyclosporine and short course methotrexate with cyclosporine and mycophenolate mofetil for GVHD prophylaxis in myeloablative allogeneic bone marrow transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2004. **34**(7): p. 621-5.
39. Luznik, L. and E.J. Fuchs, *High-dose, post-transplantation cyclophosphamide to promote graft-host tolerance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Immunol Res, 2010. **47**(1-3): p. 65-77.
40. Goodyear, O.C., et al., *Azacitidine augments expansion of regulatory T cells after allogeneic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia (AML)*. Blood, 2012. **119**(14): p. 3361-9.
41. Choi, S. and P. Reddy, *HDAC inhibition and graft versus host disease*. Mol Med, 2011. **17**(5-6): p. 404-16.
42. Koreth, J., et al., *Bortezomib, tacrolimus, and methotrexate for prophylaxis of graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation from HLA-mismatched unrelated donors*. Blood, 2009. **114**(18): p. 3956-9.
43. Karnitz, L.M. and R.T. Abraham, *Interleukin-2 receptor signaling mechanisms*. Adv Immunol, 1996. **61**: p. 147-99.
44. Colombetti, S., et al., *Prolonged TCR/CD28 engagement drives IL-2-independent T cell clonal expansion through signaling mediated by the mammalian target of rapamycin*. J Immunol, 2006. **176**(5): p. 2730-8.
45. Kaech, S.M. and W. Cui, *Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(11): p. 749-61.
46. Araki, K., A.H. Ellebedy, and R. Ahmed, *TOR in the immune system*. Curr Opin Cell Biol, 2011. **23**(6): p. 707-15.
47. Chi, H., *Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(5): p. 325-38.
48. Waickman, A.T. and J.D. Powell, *Mammalian target of rapamycin integrates diverse inputs to guide the outcome of antigen recognition in T cells*. J Immunol, 2012. **188**(10): p. 4721-9.
49. Wullschleger, S., R. Loewith, and M.N. Hall, *TOR signaling in growth and metabolism*. Cell, 2006. **124**(3): p. 471-84.
50. Rameh, L.E. and L.C. Cantley, *The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function*. J Biol Chem, 1999. **274**(13): p. 8347-50.
51. Vanhaesebroeck, B. and D.R. Alessi, *The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB*. Biochem J, 2000. **346 Pt 3**: p. 561-76.

52. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
53. Guertin, D.A. and D.M. Sabatini, *Defining the role of mTOR in cancer*. Cancer Cell, 2007. **12**(1): p. 9-22.
54. Inoki, K., et al., *TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(9): p. 648-57.
55. Kovacina, K.S., et al., *Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner*. J Biol Chem, 2003. **278**(12): p. 10189-94.
56. Gingras, A.C., et al., *Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism*. Genes Dev, 1999. **13**(11): p. 1422-37.
57. Holz, M.K., et al., *mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events*. Cell, 2005. **123**(4): p. 569-80.
58. Shahbazian, D., et al., *The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity*. EMBO J, 2006. **25**(12): p. 2781-91.
59. Wang, X., et al., *Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase*. EMBO J, 2001. **20**(16): p. 4370-9.
60. Hutchinson, J.A., et al., *Regulation of ribosomal protein S6 phosphorylation by casein kinase 1 and protein phosphatase 1*. J Biol Chem, 2011. **286**(10): p. 8688-96.
61. Barnhart, B.C., et al., *Effects of 4E-BP1 expression on hypoxic cell cycle inhibition and tumor cell proliferation and survival*. Cancer Biol Ther, 2008. **7**(9): p. 1441-9.
62. Palaniappan, M., B. Menon, and K.M. Menon, *Stimulatory effect of insulin on theca-interstitial cell proliferation and cell cycle regulatory proteins through MTORC1 dependent pathway*. Mol Cell Endocrinol, 2013. **366**(1): p. 81-9.
63. Volarevic, S., et al., *Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6*. Science, 2000. **288**(5473): p. 2045-7.
64. Wu, L.X., et al., *CD28 regulates the translation of Bcl-xL via the phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin pathway*. J Immunol, 2005. **174**(1): p. 180-94.
65. Sarbassov, D.D., et al., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*. Science, 2005. **307**(5712): p. 1098-101.
66. Hresko, R.C. and M. Mueckler, *mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes*. J Biol Chem, 2005. **280**(49): p. 40406-16.
67. Gan, X., et al., *Evidence for direct activation of mTORC2 kinase activity by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*. J Biol Chem, 2011. **286**(13): p. 10998-1002.
68. Jacinto, E., et al., *SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity*. Cell, 2006. **127**(1): p. 125-37.
69. Alessi, D.R., et al., *Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1*. EMBO J, 1996. **15**(23): p. 6541-51.
70. Garcia-Martinez, J.M. and D.R. Alessi, *mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1)*. Biochem J, 2008. **416**(3): p. 375-85.

71. Shah, O.J., Z. Wang, and T. Hunter, *Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies*. *Curr Biol*, 2004. **14**(18): p. 1650-6.
72. Tremblay, F. and A. Marette, *Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70 S6 kinase pathway. A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(41): p. 38052-60.
73. Copps, K.D. and M.F. White, *Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2*. *Diabetologia*, 2012. **55**(10): p. 2565-82.
74. Dibble, C.C., J.M. Asara, and B.D. Manning, *Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1*. *Mol Cell Biol*, 2009. **29**(21): p. 5657-70.
75. Julien, L.A., et al., *mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling*. *Mol Cell Biol*, 2010. **30**(4): p. 908-21.
76. Powell, J.D., C.G. Lerner, and R.H. Schwartz, *Inhibition of cell cycle progression by rapamycin induces T cell clonal anergy even in the presence of costimulation*. *J Immunol*, 1999. **162**(5): p. 2775-84.
77. Vanasek, T.L., et al., *Antagonistic roles for CTLA-4 and the mammalian target of rapamycin in the regulation of clonal anergy: enhanced cell cycle progression promotes recall antigen responsiveness*. *J Immunol*, 2001. **167**(10): p. 5636-44.
78. Zheng, Y., et al., *A role for mammalian target of rapamycin in regulating T cell activation versus anergy*. *J Immunol*, 2007. **178**(4): p. 2163-70.
79. Shenoy, A.R., S. Kirschnek, and G. Hacker, *IL-15 regulates Bcl-2 family members Bim and Mcl-1 through JAK/STAT and PI3K/AKT pathways in T cells*. *Eur J Immunol*, 2014. **44**(8): p. 2500-7.
80. Zhang, L., et al., *TSC1/2 signaling complex is essential for peripheral naive CD8+ T cell survival and homeostasis in mice*. *PLoS One*, 2012. **7**(2): p. e30592.
81. Mondino, A. and D.L. Mueller, *mTOR at the crossroads of T cell proliferation and tolerance*. *Semin Immunol*, 2007. **19**(3): p. 162-72.
82. Brennan, P., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase couples the interleukin-2 receptor to the cell cycle regulator E2F*. *Immunity*, 1997. **7**(5): p. 679-89.
83. Appleman, L.J., et al., *CD28 costimulation mediates down-regulation of p27kip1 and cell cycle progression by activation of the PI3K/PKB signaling pathway in primary human T cells*. *J Immunol*, 2002. **168**(6): p. 2729-36.
84. Morice, W.G., et al., *Rapamycin-induced inhibition of p34cdc2 kinase activation is associated with G1/S-phase growth arrest in T lymphocytes*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(5): p. 3734-8.
85. Nourse, J., et al., *Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin*. *Nature*, 1994. **372**(6506): p. 570-3.
86. Delgoffe, G.M., et al., *The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(4): p. 295-303.
87. Delgoffe, G.M., et al., *The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment*. *Immunity*, 2009. **30**(6): p. 832-44.

88. Lee, K., et al., *Mammalian target of rapamycin protein complex 2 regulates differentiation of Th1 and Th2 cell subsets via distinct signaling pathways*. *Immunity*, 2010. **32**(6): p. 743-53.
89. Battaglia, M., A. Stabilini, and M.G. Roncarolo, *Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells*. *Blood*, 2005. **105**(12): p. 4743-8.
90. Gao, W., et al., *Contrasting effects of cyclosporine and rapamycin in de novo generation of alloantigen-specific regulatory T cells*. *Am J Transplant*, 2007. **7**(7): p. 1722-32.
91. Valmori, D., et al., *Rapamycin-mediated enrichment of T cells with regulatory activity in stimulated CD4+ T cell cultures is not due to the selective expansion of naturally occurring regulatory T cells but to the induction of regulatory functions in conventional CD4+ T cells*. *J Immunol*, 2006. **177**(2): p. 944-9.
92. Araki, K., et al., *mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation*. *Nature*, 2009. **460**(7251): p. 108-12.
93. Pearce, E.L., et al., *Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism*. *Nature*, 2009. **460**(7251): p. 103-7.
94. Ferrer, I.R., et al., *Cutting edge: Rapamycin augments pathogen-specific but not graft-reactive CD8+ T cell responses*. *J Immunol*, 2010. **185**(4): p. 2004-8.
95. Rao, R.R., et al., *The mTOR kinase determines effector versus memory CD8+ T cell fate by regulating the expression of transcription factors T-bet and Eomesodermin*. *Immunity*, 2010. **32**(1): p. 67-78.
96. Turner, A.P., et al., *Sirolimus enhances the magnitude and quality of viral-specific CD8+ T-cell responses to vaccinia virus vaccination in rhesus macaques*. *Am J Transplant*, 2011. **11**(3): p. 613-8.
97. Araki, K., B. Youngblood, and R. Ahmed, *The role of mTOR in memory CD8 T-cell differentiation*. *Immunol Rev*, 2010. **235**(1): p. 234-43.
98. Li, Q., et al., *A central role for mTOR kinase in homeostatic proliferation induced CD8+ T cell memory and tumor immunity*. *Immunity*, 2011. **34**(4): p. 541-53.
99. Lazarevic, V., L.H. Glimcher, and G.M. Lord, *T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2013. **13**(11): p. 777-89.
100. Vezina, C., A. Kudelski, and S.N. Sehgal, *Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle*. *J Antibiot (Tokyo)*, 1975. **28**(10): p. 721-6.
101. Sehgal, S.N., H. Baker, and C. Vezina, *Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization*. *J Antibiot (Tokyo)*, 1975. **28**(10): p. 727-32.
102. Sarbassov, D.D., et al., *Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB*. *Mol Cell*, 2006. **22**(2): p. 159-68.
103. Johnson, R.W., *Sirolimus (Rapamune) in renal transplantation*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2002. **11**(6): p. 603-7.
104. Abouelnasr, A., et al., *Defining the role of sirolimus in the management of graft-versus-host disease: from prophylaxis to treatment*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2013. **19**(1): p. 12-21.
105. Thomson, A.W., H.R. Turnquist, and G. Raimondi, *Immunoregulatory functions of mTOR inhibition*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(5): p. 324-37.
106. Blazar, B.R., et al., *Rapamycin inhibits the generation of graft-versus-host disease- and graft-versus-leukemia-causing T cells by interfering with the*

- production of Th1 or Th1 cytotoxic cytokines.* J Immunol, 1998. **160**(11): p. 5355-65.
107. Kopf, H., et al., *Rapamycin inhibits differentiation of Th17 cells and promotes generation of FoxP3+ T regulatory cells.* Int Immunopharmacol, 2007. **7**(13): p. 1819-24.
  108. Strauss, L., et al., *Selective survival of naturally occurring human CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells cultured with rapamycin.* J Immunol, 2007. **178**(1): p. 320-9.
  109. Perez-Simon, J.A., et al., *The combination of sirolimus plus tacrolimus improves outcome after reduced-intensity conditioning, unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation compared with cyclosporine plus mycophenolate.* Haematologica, 2013. **98**(4): p. 526-32.
  110. Cutler, C., et al., *Extended follow-up of methotrexate-free immunosuppression using sirolimus and tacrolimus in related and unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation.* Blood, 2007. **109**(7): p. 3108-14.
  111. Rodriguez, R., et al., *A phase II pilot study of tacrolimus/sirolimus GVHD prophylaxis for sibling donor hematopoietic stem cell transplantation using 3 conditioning regimens.* Blood, 2010. **115**(5): p. 1098-105.
  112. Rosenbeck, L.L., et al., *Prophylaxis with sirolimus and tacrolimus +/- antithymocyte globulin reduces the risk of acute graft-versus-host disease without an overall survival benefit following allogeneic stem cell transplantation.* Biol Blood Marrow Transplant, 2011. **17**(6): p. 916-22.
  113. Schleuning, M., et al., *Calcineurin inhibitor-free GVHD prophylaxis with sirolimus, mycophenolate mofetil and ATG in Allo-SCT for leukemia patients with high relapse risk: an observational cohort study.* Bone Marrow Transplant, 2009. **43**(9): p. 717-23.
  114. Ghez, D., et al., *Rapamycin for refractory acute graft-versus-host disease.* Transplantation, 2009. **88**(9): p. 1081-7.
  115. Hoda, D., et al., *Sirolimus for treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease.* Bone Marrow Transplant, 2010. **45**(8): p. 1347-51.
  116. Pidala, J., et al., *Sirolimus demonstrates activity in the primary therapy of acute graft-versus-host disease without systemic glucocorticoids.* Haematologica, 2011. **96**(9): p. 1351-6.
  117. Jedlickova, Z., et al., *Therapy of sclerodermatous chronic graft-versus-host disease with mammalian target of rapamycin inhibitors.* Biol Blood Marrow Transplant, 2011. **17**(5): p. 657-63.
  118. Couriel, D.R., et al., *Sirolimus in combination with tacrolimus and corticosteroids for the treatment of resistant chronic graft-versus-host disease.* Br J Haematol, 2005. **130**(3): p. 409-17.
  119. Jurado, M., et al., *Sirolimus as part of immunosuppressive therapy for refractory chronic graft-versus-host disease.* Biol Blood Marrow Transplant, 2007. **13**(6): p. 701-6.
  120. Yao, J.C., et al., *Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors.* N Engl J Med, 2011. **364**(6): p. 514-23.
  121. Hess, G., et al., *Phase III study to evaluate temsirolimus compared with investigator's choice therapy for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma.* J Clin Oncol, 2009. **27**(23): p. 3822-9.
  122. Baselga, J., et al., *Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer.* N Engl J Med, 2012. **366**(6): p. 520-9.

123. Benjamin, D., et al., *Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors*. Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(11): p. 868-80.
124. Sun, S.Y., *mTOR kinase inhibitors as potential cancer therapeutic drugs*. Cancer Lett, 2013. **340**(1): p. 1-8.
125. O'Reilly, K.E., et al., *mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt*. Cancer Res, 2006. **66**(3): p. 1500-8.
126. Rodrik-Outmezguine, V.S., et al., *mTOR kinase inhibition causes feedback-dependent biphasic regulation of AKT signaling*. Cancer Discov, 2011. **1**(3): p. 248-59.
127. Choo, A.Y., et al., *Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(45): p. 17414-9.
128. Feldman, M.E., et al., *Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2*. PLoS Biol, 2009. **7**(2): p. e38.
129. Thoreen, C.C., et al., *An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1*. J Biol Chem, 2009. **284**(12): p. 8023-32.
130. Maira, S.M., et al., *Identification and characterization of NVP-BKM120, an orally available pan-class I PI3-kinase inhibitor*. Mol Cancer Ther, 2012. **11**(2): p. 317-28.
131. Zheng, Y., et al., *Novel phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor NVP-BKM120 induces apoptosis in myeloma cells and shows synergistic anti-myeloma activity with dexamethasone*. J Mol Med (Berl), 2012. **90**(6): p. 695-706.
132. Rosich, L., et al., *The phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor NVP-BKM120 overcomes resistance signals derived from microenvironment by regulating the Akt/FoxO3a/Bim axis in chronic lymphocytic leukemia cells*. Haematologica, 2013. **98**(11): p. 1739-47.
133. Koul, D., et al., *Antitumor activity of NVP-BKM120--a selective pan class I PI3 kinase inhibitor showed differential forms of cell death based on p53 status of glioma cells*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(1): p. 184-95.
134. Burger, M.T., et al., *Identification of NVP-BKM120 as a Potent, Selective, Orally Bioavailable Class I PI3 Kinase Inhibitor for Treating Cancer*. ACS Med Chem Lett, 2011. **2**(10): p. 774-9.
135. Mueller, A., et al., *Selective PI3K inhibition by BKM120 and BEZ235 alone or in combination with chemotherapy in wild-type and mutated human gastrointestinal cancer cell lines*. Cancer Chemother Pharmacol, 2012. **69**(6): p. 1601-15.
136. Serova, M., et al., *Benchmarking effects of mTOR, PI3K, and dual PI3K/mTOR inhibitors in hepatocellular and renal cell carcinoma models developing resistance to sunitinib and sorafenib*. Cancer Chemother Pharmacol, 2013. **71**(5): p. 1297-307.
137. Liang, Y.C., et al., *Effects of PI3K inhibitor NVP-BKM120 on acquired resistance to gefitinib of human lung adenocarcinoma H1975 cells*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2013. **33**(6): p. 845-51.
138. Ren, H., et al., *The combination of RAD001 and NVP-BKM120 synergistically inhibits the growth of lung cancer in vitro and in vivo*. Cancer Lett, 2012. **325**(2): p. 139-46.
139. Ren, H., et al., *The PI3 kinase inhibitor NVP-BKM120 induces GSK3/FBXW7-dependent Mcl-1 degradation, contributing to induction of apoptosis and*

- enhancement of TRAIL-induced apoptosis. Cancer Lett, 2013. 338(2): p. 229-38.*
140. Mayer, I.A., et al., *Stand up to cancer phase Ib study of pan-phosphoinositide-3-kinase inhibitor buparlisib with letrozole in estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. J Clin Oncol, 2014. 32(12): p. 1202-9.*
  141. Bendell, J.C., et al., *Phase I, dose-escalation study of BKM120, an oral pan-Class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. J Clin Oncol, 2012. 30(3): p. 282-90.*
  142. Rodon, J., et al., *Phase I dose-escalation and -expansion study of buparlisib (BKM120), an oral pan-Class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. Invest New Drugs, 2014. 32(4): p. 670-81.*
  143. Cooke, K.R., et al., *An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. Blood, 1996. 88(8): p. 3230-9.*
  144. Tabernero, J., et al., *Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. J Clin Oncol, 2008. 26(10): p. 1603-10.*
  145. Wang, X. and S.Y. Sun, *Enhancing mTOR-targeted cancer therapy. Expert Opin Ther Targets, 2009. 13(10): p. 1193-203.*
  146. Vilar, E., J. Perez-Garcia, and J. Tabernero, *Pushing the envelope in the mTOR pathway: the second generation of inhibitors. Mol Cancer Ther, 2011. 10(3): p. 395-403.*
  147. Yamashita, D., et al., *hDREF regulates cell proliferation and expression of ribosomal protein genes. Mol Cell Biol, 2007. 27(6): p. 2003-13.*
  148. Nosrati, N., N.R. Kapoor, and V. Kumar, *Combinatorial action of transcription factors orchestrates cell cycle-dependent expression of the ribosomal protein genes and ribosome biogenesis. FEBS J, 2014. 281(10): p. 2339-52.*
  149. Rolli-Derkinderen, M., et al., *ERK and p38 inhibit the expression of 4E-BP1 repressor of translation through induction of Egr-1. J Biol Chem, 2003. 278(21): p. 18859-67.*
  150. Tato, I., et al., *Amino acids activate mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) via PI3K/Akt signaling. J Biol Chem, 2011. 286(8): p. 6128-42.*
  151. Tomasoni, R., et al., *Rapamycin-sensitive signals control TCR/CD28-driven *Irfng*, *Il4* and *Foxp3* transcription and promoter region methylation. Eur J Immunol, 2011. 41(7): p. 2086-96.*
  152. Breuleux, M., et al., *Increased AKT S473 phosphorylation after mTORC1 inhibition is rictor dependent and does not predict tumor cell response to PI3K/mTOR inhibition. Mol Cancer Ther, 2009. 8(4): p. 742-53.*
  153. Slavik, J.M., et al., *Uncoupling p70(s6) kinase activation and proliferation: rapamycin-resistant proliferation of human CD8(+) T lymphocytes. J Immunol, 2001. 166(5): p. 3201-9.*
  154. Slavik, J.M., et al., *Rapamycin-resistant proliferation of CD8+ T cells correlates with p27kip1 down-regulation and bcl-xL induction, and is prevented by an inhibitor of phosphoinositide 3-kinase activity. J Biol Chem, 2004. 279(2): p. 910-9.*
  155. Dumont, F.J. and Q. Su, *Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin. Life Sci, 1996. 58(5): p. 373-95.*

156. Fischer, K., et al., *Antigen recognition induces phosphatidylserine exposure on the cell surface of human CD8+ T cells*. Blood, 2006. **108**(13): p. 4094-101.
157. Miossec, C., et al., *Evidence for CPP32 activation in the absence of apoptosis during T lymphocyte stimulation*. J Biol Chem, 1997. **272**(21): p. 13459-62.
158. Alam, A., et al., *Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells*. J Exp Med, 1999. **190**(12): p. 1879-90.
159. Kennedy, N.J., et al., *Caspase activation is required for T cell proliferation*. J Exp Med, 1999. **190**(12): p. 1891-6.
160. McComb, S., R. Mulligan, and S. Sad, *Caspase-3 is transiently activated without cell death during early antigen driven expansion of CD8(+) T cells in vivo*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15328.
161. Hayden, M.S., A.P. West, and S. Ghosh, *NF-kappaB and the immune response*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6758-80.
162. Staruch, M.J., N.H. Sigal, and F.J. Dumont, *Differential effects of the immunosuppressive macrolides FK-506 and rapamycin on activation-induced T-cell apoptosis*. Int J Immunopharmacol, 1991. **13**(6): p. 677-85.
163. Li, Y., et al., *Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance*. Nat Med, 1999. **5**(11): p. 1298-302.
164. Amarnath, S., et al., *Rapamycin generates anti-apoptotic human Th1/Tc1 cells via autophagy for induction of xenogeneic GVHD*. Autophagy, 2010. **6**(4): p. 523-41.
165. Mariotti, J., et al., *Ex vivo rapamycin generates apoptosis-resistant donor Th2 cells that persist in vivo and prevent hemopoietic stem cell graft rejection*. J Immunol, 2008. **180**(1): p. 89-105.
166. O'Brien, T.F. and X.P. Zhong, *The role and regulation of mTOR in T-lymphocyte function*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2012. **60**(3): p. 173-81.
167. Jung, U., et al., *Ex vivo rapamycin generates Th1/Tc1 or Th2/Tc2 Effector T cells with enhanced in vivo function and differential sensitivity to post-transplant rapamycin therapy*. Biol Blood Marrow Transplant, 2006. **12**(9): p. 905-18.
168. Muller-Steinhardt, M., et al., *The pharmacodynamic effect of sirolimus: individual variation of cytokine mRNA expression profiles in human whole blood samples*. Immunobiology, 2009. **214**(1): p. 17-26.
169. Chen, S., et al., *Effect of inhibiting the signal of mammalian target of rapamycin on memory T cells*. Transplant Proc, 2014. **46**(5): p. 1642-8.
170. Hegazy, A.N., et al., *Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions*. Immunity, 2010. **32**(1): p. 116-28.
171. Hwang, E.S., J.H. Hong, and L.H. Glimcher, *IL-2 production in developing Th1 cells is regulated by heterodimerization of RelA and T-bet and requires T-bet serine residue 508*. J Exp Med, 2005. **202**(9): p. 1289-300.
172. Oh, S. and E.S. Hwang, *The role of protein modifications of T-bet in cytokine production and differentiation of T helper cells*. J Immunol Res, 2014. **2014**: p. 589672.

173. Shin, H.J., et al., *Rapamycin and IL-2 reduce lethal acute graft-versus-host disease associated with increased expansion of donor type CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells*. Blood, 2011. **118**(8): p. 2342-50.
174. Koreth, J., et al., *Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease*. N Engl J Med, 2011. **365**(22): p. 2055-66.
175. Kennedy-Nasser, A.A., et al., *Ultra low-dose IL-2 for GVHD prophylaxis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation mediates expansion of regulatory T cells without diminishing antiviral and antileukemic activity*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(8): p. 2215-25.
176. Woerly, G., N. Brooks, and B. Ryffel, *Effect of rapamycin on the expression of the IL-2 receptor (CD25)*. Clin Exp Immunol, 1996. **103**(2): p. 322-7.
177. Isakov, N. and A. Altman, *Protein kinase C(theta) in T cell activation*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 761-94.
178. Pearce, E.L., et al., *Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin*. Science, 2003. **302**(5647): p. 1041-3.
179. Glimcher, L.H., et al., *Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(11): p. 900-11.
180. Qui, H.Z., et al., *CD134 plus CD137 dual costimulation induces Eomesodermin in CD4 T cells to program cytotoxic Th1 differentiation*. J Immunol, 2011. **187**(7): p. 3555-64.
181. Nikolaeva, N., et al., *Rapamycin does not induce anergy but inhibits expansion and differentiation of alloreactive human T cells*. Transplantation, 2006. **81**(3): p. 445-54.
182. Rao, R.R., et al., *Transcription factor Foxo1 represses T-bet-mediated effector functions and promotes memory CD8(+) T cell differentiation*. Immunity, 2012. **36**(3): p. 374-87.
183. Obar, J.J. and L. Lefrancois, *Early events governing memory CD8+ T-cell differentiation*. Int Immunol, 2010. **22**(8): p. 619-25.
184. Arstila, T.P., et al., *A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity*. Science, 1999. **286**(5441): p. 958-61.
185. Zhang, Y., et al., *Host-reactive CD8+ memory stem cells in graft-versus-host disease*. Nat Med, 2005. **11**(12): p. 1299-305.
186. Juchem, K.W., et al., *A repertoire-independent and cell-intrinsic defect in murine GVHD induction by effector memory T cells*. Blood, 2011. **118**(23): p. 6209-19.
187. Chen, B.J., et al., *Transfer of allogeneic CD62L- memory T cells without graft-versus-host disease*. Blood, 2004. **103**(4): p. 1534-41.
188. Boeckh, M. and P. Ljungman, *How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients*. Blood, 2009. **113**(23): p. 5711-9.
189. McMahon, G., et al., *The evolving role of mTOR inhibition in transplantation tolerance*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(3): p. 408-15.
190. Marty, F.M., et al., *Sirolimus-based graft-versus-host disease prophylaxis protects against cytomegalovirus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a cohort analysis*. Blood, 2007. **110**(2): p. 490-500.
191. Blazar, B.R., et al., *Rapamycin prolongs survival of murine recipients of fully allogeneic donor grafts when administered during the graft-versus-host disease process*. Ann N Y Acad Sci, 1993. **685**: p. 73-85.
192. Blazar, B.R., et al., *Murine recipients of fully mismatched donor marrow are protected from lethal graft-versus-host disease by the in vivo administration*

- of rapamycin but develop an autoimmune-like syndrome. J Immunol, 1993. 151(10): p. 5726-41.*
193. Dy, G.K. and A.A. Adjei, *Understanding, recognizing, and managing toxicities of targeted anticancer therapies. CA Cancer J Clin, 2013. 63(4): p. 249-79.*
194. Hippen, K.L., et al., *Generation and large-scale expansion of human inducible regulatory T cells that suppress graft-versus-host disease. Am J Transplant, 2011. 11(6): p. 1148-57.*