



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
MEDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

EVALUACION DEL EFECTO DE LA GLOBULINA POLICLONAL ANTI-TIMOCITO  
EN LA PROLIFERACION HOMESOTÁTICA DEL LINFOCITO T Y EN LA  
PREVENCIÓN DEL RECHAZO CELULAR AGUDO DEL INJERTO RENAL

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

DR. RAFAEL VALDEZ ORTIZ

**TUTORES**

DR. JOSEP GRINYÓ I BOIRA  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MEDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DR. RICARDO CORREA ROTTER  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MEDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MEXICO, D.F. ABRIL DEL 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **TITULO**

Evaluación del efecto de la globulina policlonal anti-timocito de rata en la proliferación homeostática experimental.

## **AUTORES Y ADSCRIPCIONES**

### **Alumno:**

Dr. Rafael Valdez Ortiz <sup>1</sup>

### **Tutores**

Dr. Josep Grinyó i Boira <sup>2</sup>

Dr. Ricardo Correa-Rotter <sup>3</sup>

1. Servicio de Nefrología Hospital General de México, Dr. Eduardo Liceaga, México DF.
2. Departamento de Nefrología Experimental del Hospital Universitario de Bellvitge, Barcelona España.
3. Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México D.F.

## **AREA DE INVESTIGACION**

Inmunología y Trasplante Renal.

## **LINEA DE INVESTIGACION**

Proliferación homeostática de linfocitos

## PRODUCTIVIDAD CIENTIFICA DURANTE EL DOCTORADO

### I.- Relacionados con el proyecto de investigación:

- 1) Valdez-Ortiz R, Bestard O, Llaudó I, Franquesa M, Cerezo G, Torras J, Herrero-Fresneda I, Correa-Rotter R, Grinyó JM. Induction of suppressive allogeneic regulatory T cells via rabbit antithymocyte polyclonal globulin during homeostatic proliferation in rat kidney transplantation. *Transpl Int*. 2015 Jan;28(1):108-19.
- 2) Bestard O, Cuñetti L, Cruzado JM, Lucia M, Valdez-Ortiz R, Olek S, Melilli E, Torras J, Mast R, Gomà M, Franquesa M, Grinyó JM. Intra-graft regulatory T cells in protocol biopsies retain foxp3 demethylation and are protective biomarkers for kidney graft outcome. *Am J Transplant*. 2011 Oct;11(10):2162-72.
- 3) Valdez-Ortiz R, Herrero-Fresneda E, Herrero-Fresneda I. Comparison of two types of urological anastomosis in renal transplantation rats. *Microsurgery* (enviado a publicación 2014).

### II.- No relacionados con el proyecto de investigación:

- 1) Rossano A, Valdez-Ortiz R, Garcia L, Valdés O, Cícero A, Hinojosa H, Fernandez D, Bautista R, Díaz P, Zavala J, Navarro-Reynoso F, Soto V, San-Cristobal P, Díliz HS. Reproducible model to perform kidney transplantation in a low-resource population. *Transplant Proc*. 2014;46(9):3032-8.
- 2) Medina-Godoy S, Rodríguez-Yáñez SK, Bobadilla NA, Pérez-Villalva R, Valdez-Ortiz R, Hong E, Luna-Suárez S, Paredes-López O, Valdez-Ortiz A Antihypertensive activity of AMC3, an engineered 11S amaranth globulin expressed in *Escherichia coli*, in spontaneously hypertensive rats *Journal of Functional Foods* 5:1441-1449, 2013
- 3) Torres Muñoz A, Valdez-Ortiz R, González-Parra C, Espinoza-Dávila E, Morales-Buenrostro LE, Correa-Rotter R. Percutaneous renal biopsy of native kidneys: efficiency, safety and risk factors associated with major complications. *Arch Med Sci*. 2011 Oct;7(5):823-31.
- 4) Valdez-Ortiz R, Sifuentes-Osornio J, Morales-Buenrostro LE, Ayala-Palma H, Dehesa-López E, Alberú J, Correa-Rotter R. Risk factors for infections requiring hospitalization in renal transplant recipients: a cohort study. *Int J Infect Dis*. 2011 Mar;15(3):e188-96

## **TECNICAS Y HABILIDADES ADQUIRIDAS DURANTE EL DOCTORADO**

- I. Trasplante renal alogénico y singénico de modelos murinos.
- II. Técnicas de microcirugía en anastomosis vasculares y uretero-vesicales
- III. Conocimiento y manejo de equipos de citometría de flujo.
- IV. Desarrollo de cultivos celulares y ensayos de proliferación celular con CFSE y BrdU.
- V. Aislamiento y separación de células por técnicas de Cell Sorter.
- VI. Manejo experimental de especies de ratas de laboratorio para administración oral, intravenosa, intraperitoneal de medicamentos y toma de muestras sanguíneas.
- VII. Modelos experimentales de isquemia caliente y reperfusión en ratas.
- VIII. Modelos experimentales de isquemia fría y reperfusión en ratas.
- IX. Evaluación de estudios funcionales de riñón para cuantificación de flujo sanguíneo renal, depuración de creatinina en orina de 24 horas, tasa de filtrado glomerular y análisis de muestras sanguíneas y orina.
- X. Análisis e interpretación histopatológicas de muestras de tejido renal de injertos murinos.

## **ABREVIATURAS**

**ATG**, *Globulina policlonal de conejo anti-timocito*

**FELASA**, *Federation of European Laboratory Animal Science Association*

**PBS**, *Solución amortiguadora de fosfatos*

**CD3+**, *Linfocitos T CD3+*

**CD4+**, *Linfocitos T CD4+*

**CD8+**, *Linfocitos T CD8+*

**CD4+CD45RA+**, *Linfocito B*

**CD161+**, *Células asesinas naturales*

**CD4+CD45R**, *Célula T CD4+ naïve*

**CD4+CD45R<sup>high</sup>**, *Células T CD4+ de memoria efectora*

**CD4+CD25++FoxP3+**, *Células T reguladoras*

**CD4+CD25+++FoxP3+**, *Células T reguladoras*

**Células NK**, *Células asesinas naturales*

**Tregs**, *Célula T reguladoras*

**CFSE**, *Succinimidil éster diacetato de carboxifluoresceína*

**CD8+CFSE+**, *Proliferación de células T CD8+*

**PBMC**, *Células de sangre periféricas mononucleares*

**FACS**, *Clasificación celular asistida por fluorescencia*

**FITC**, *Isotiocinato de fluoresceína*

**APC**, *Aloficocianina*

**PerCP**, *Proteína de peridin clorofila*

**PE**, *Ficoeritrina*

**BrdU**, *5-bromo-2-desoxiuridina*

**TCR**, *Receptor de células T*

## RESUMEN

**Introducción:** Estudios experimentales han demostrado la capacidad de la globulina policlonal anti-timocito para expandir las células T reguladoras, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Tregs). **Objetivos:** Nosotros investigamos los principales efectos biológicos de una globulina policlonal anti-timocito (ATG) específica para ratas Wistar desarrollada en nuestro laboratorio. Posteriormente evaluamos la capacidad de las Tregs inducidas por ATG para suprimir la proliferación de células T CD8<sup>+</sup>. Finalmente evaluamos el impacto que una terapia de inducción con ATG tendría para reducir el riesgo de rechazo agudo en un modelo alógeno de trasplante renal experimental. **Resultados:** Se demostró una adecuada capacidad de unión del ATG con linfocitos CD3<sup>+</sup>. Se confirmó la capacidad para inducir apoptosis en cultivos con linfocitos CD3<sup>+</sup>. La proliferación homeostática inducida con la administración de diferentes dosis intravenosas de ATG se caracterizó por una rápida pero transitoria depleción de CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y Tregs directamente proporcional a la dosis de ATG, pero con una limitada capacidad para depletar células T de memoria efectoras. Se demostró un incremento en el cociente de células Tregs/células T efectoras. Un hallazgo interesante fue demostrar la capacidad de las Tregs inducidas por ATG para suprimir la proliferación de células CD8<sup>+</sup> en cultivos alógenos donante-específico. La evaluación de la función del injerto renal fue superior en las ratas trasplantadas que recibieron terapia de inducción con ATG, hallazgos asociados con ausencia histológica de rechazo celular agudo en el tejido renal. **Conclusiones:** Nuestros resultados mostraron los efectos biológicos de una ATG en subpoblaciones celulares de linfocitos T. Se demostró la capacidad de la ATG para inducir células T reguladoras con capacidad de supresión de células T efectoras. Estos resultados confirman la capacidad inmunomoduladora de la globulina policlonal anti-timocito.

**PALABRAS CLAVE:** Proliferación homeostática. ATG. Trasplante renal. Tregs.

# INDICE

## I. MARCO TEORICO

1.1	Introducción	8
1.2	Definición y tipos de proliferación homeostática	10
1.3	Efecto de la proliferación homeostática en trasplantes	13
1.4	Historia de la globulina policlonal anti-timocito	15
1.5	Generación y mecanismo de acción de la ATG	17
1.6	Caracterización de la HP inducida por ATG	24
1.7	Evaluación clínica de la administración de ATG	26

<b>II.</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>32</b>
------------	-----------------------------------	-----------

<b>III.</b>	<b>PREGUNTAS DE INVESTIGACION</b>	<b>32</b>
-------------	-----------------------------------	-----------

<b>IV.</b>	<b>JUSTIFICACION</b>	<b>33</b>
------------	----------------------	-----------

<b>V.</b>	<b>HIPOTESIS</b>	<b>33</b>
-----------	------------------	-----------

<b>VI.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
------------	------------------	-----------

<b>VII.</b>	<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>36</b>
-------------	-----------------------------	-----------

1.1	Animales y diseño experimental	36
1.2	Generación de ATG de conejo específica para rata	37
1.3	Caracterización fenotípica y separación celular	38
1.4	Ensayos de unión farmacológica	38
1.5	Cultivos celulares y evaluación de la apoptosis	39
1.6	Ensayos de proliferación celular utilizando BrdU	40
1.7	Modelo de trasplante renal y terapia de inducción con ATG	40
1.8	Protocolo de cuidado y seguimiento postrasplante renal	41
1.9	Ensayos funcionales ex-vivo de supresión	42
1.10	Análisis estadístico	43

<b>VIII.</b>	<b>DEFINICION OPERACIONAL DE VARIABLES</b>	<b>44</b>
--------------	--	-----------

<b>IX.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>45</b>
------------	-------------------	-----------

<b>X.</b>	<b>DISCUSION</b>	<b>61</b>
-----------	------------------	-----------

<b>XI.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>68</b>
------------	---------------------	-----------

## I. MARCO TEORICO

### 1.1 Introducción.

La proliferación homeostática es un fenómeno biológico de re-población celular, que aparece habitualmente luego de un estado de depleción celular, por ejemplo, estatus post-quimioterapia o posterior a la administración de terapia de inducción en protocolos de trasplante de órganos (1-4). Actualmente se sabe que la proliferación homeostática, es impulsada por un exceso funcional de citocinas, principalmente, la interacción de la interleucina 7 con su receptor de membrana (5-6). Originalmente se pensaba que la proliferación homeostática se trataba de un proceso benigno y que simplemente constituía un proceso de reconstitución del sistema inmunológico (2). Sin embargo, estudios han demostrado que los linfocitos T que proliferan, adquieren propiedades de células de memoria y de citotoxicidad (7).

El impacto de la proliferación homeostática en los trasplantes de órganos fue evaluado por primera vez en ratones con inmunodeficiencia combinada severa, sometidos a un trasplante de corazón (8). Estos ratones, recibieron la administración intravenosa de linfocitos T (proliferación homeostática experimentalmente inducida), lo que ocasionó una reducción rápida y significativa de la supervivencia del injerto, a pesar incluso de maniobras inductoras de tolerancia inmunológica (8).

La globulina policlonal anti-timocito de conejo (ATG), son anticuerpos

utilizados en la práctica clínica desde hace más de tres décadas (9-11). Las indicaciones clínicas actuales para la administración de ATG son: 1) rechazo al injerto resistente a esteroides, 2) rechazo vascular severo, 3) enfermedad injerto contra huésped, 4) anemia aplásica y 5) terapia de inducción en trasplantes de órganos sólidos (12-14).

La administración intravenosa de la ATG, ocasiona una rápida depleción de linfocitos en la sangre periférica, como resultado de al menos tres mecanismos de acción: 1) citotoxicidad directa, 2) apoptosis mediada por complemento y 3) opsonización (15, 16). Sin embargo, debido al origen policlonal de estos anticuerpos, podrían existir otros posibles mecanismos de acción que potencialmente estarían implicados en la modulación de la respuesta inmunológica (16).

Como fue comentado previamente, la administración de ATG genera una depleción linfocitaria con una subsecuente re-población celular (15). Los estudios que describieron la caracterización fenotípica de la proliferación homeostática secundaria a la administración de la ATG, fueron realizados inicialmente en animales de experimentación (17, 18). Sin embargo, fue el trabajo de *López y colaboradores*, quienes por primera vez describieron la capacidad de la ATG para inducir in vitro células T reguladoras, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup>Foxp3<sup>+</sup> (19). A partir de estos hallazgos, se publicaron algunos estudios que intentaron demostrar la capacidad del ATG para generar células T reguladoras durante la proliferación homeostática con resultados contrastantes (20-24). Con base en lo anterior, nuestro objetivo principal fue caracterizar la

proliferación homeostática inducida con la administración de una globulina policlonal anti-timocito de conejo anti rata Wistar. Para cumplir lo anterior, primero desarrollamos una ATG específica para rata y evaluamos sus efectos in vitro en poblaciones de linfocitos T CD3+. Subsecuentemente, caracterizamos la proliferación homeostática obtenida con la administración intravenosa de diferentes dosis de ATG en ratas Wistar. De forma secundaria, estudiamos la capacidad supresora de las células T reguladoras, inducidas por la administración de ATG y obtenidas de la sangre periférica de ratas con trasplante renal no singénico.

## **1.2 Definición y tipos de proliferación homeostática.**

A lo largo de la vida, el número y composición de linfocitos en sangre periférica está estrechamente regulados y habitualmente se mantienen en niveles relativamente constantes (25). Se han identificado algunos principios generales que regulan la respuesta fisiológica a posibles alteraciones de este equilibrio (4, 6). En primer lugar, los insultos que son capaces de generar una depleción de linfocitos periféricos (por ejemplo, infecciones virales, quimioterapia o fármacos depletos de linfocitos), son capaces a su vez de estimular una re-población del compartimiento celular, hasta alcanzar una "plenitud" en las cifras de linfocitos (1). En segundo lugar, existen mecanismos inmunológicos para garantizar que no se supere esta "plenitud", por ejemplo, la rápida expansión de células T CD8+ periféricas en respuesta a antígenos

virales, es seguido, por la muerte masiva de células efectoras una vez que la respuesta inmunitaria se ha reducido. De esta manera se ocasiona una restauración en las cifras normales de linfocitos (26). En tercer lugar, se ha identificado que las distintas sub-poblaciones linfocitarias, ocupan diferentes "nichos" en el organismo de acuerdo a factores de crecimiento o citocinas, determinando con ello, cifras específicas de linfocitos T dependiendo de los diferentes sitios anatómicos (27).

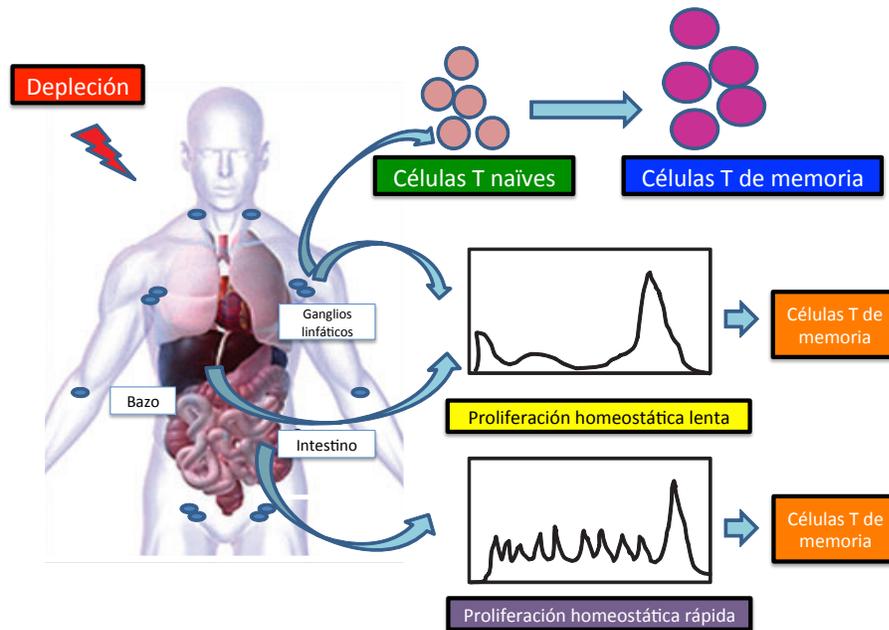
Desde su definición a principios de los años noventas, el concepto de proliferación homeostática fue asociado a una respuesta fisiológica de re-población celular (2). Sin embargo, estudios posteriores revelaron que la proliferación homeostática puede ser un fenómeno biológico negativo del sistema inmune en contra del organismo (27).

La proliferación homeostática consiste en una re-población celular para mantener cifras normales de linfocitos (1). Habitualmente aparece posterior a fenómenos de depleción celular como la inmunosupresión pre-trasplante, el estatus post-quimioterapia ó la proliferación celular fisiológica del período neonatal (27). Se sabe que la proliferación homeostática depende de un exceso funcional de interleucina 7 (IL7) y de su interacción con su receptor específico de membrana (5). Este receptor es un heterodímero que se expresa en varios tipos celulares y está compuesto de una cadena alfa (CD127) y una cadena gamma (CD132), esta última es una cadena común debido a que puede interactuar con algunas otras interleucinas (28, 29).

Después de un estado de linfodepleción, la reconstitución de células T depende de dos mecanismos diferentes (1). El primero es la timopoyesis que resulta en la generación de nuevas células T vírgenes (naïves) y el segundo mecanismo se da con la expansión espontánea de la reserva periférica de linfocitos T (1). La relativa contribución de estos dos mecanismos depende de factores como la edad, la función del timo, la disponibilidad de citoquinas y del grado de depleción celular (29).

De acuerdo con el tiempo de respuesta, existen dos tipos principales de proliferación homeostática (HP): una HP lenta la cual se caracteriza por ser una respuesta a la detección de un "espacio vacío". Ocurre en los órganos linfoides y se produce entre las primeras 24-36 horas de la depleción celular. Este tipo de proliferación es dependiente de los niveles de IL-7 y de la interacción con el complejo mayor de histocompatibilidad (30). Un hallazgo asociado con la HP lenta, es la proliferación inicial de células T naïves que se convertirán a células T de memoria (31). Por otro lado, se ha descrito un segundo tipo de proliferación homeostática rápida (HP rápida), que aparece en las primeras 6 a 8 horas luego de la depleción celular y que se ha demostrado cierta modulación por la flora bacteriana intestinal (30). La HP rápida se caracteriza por ser una respuesta antígeno específica dependiente de las moléculas de coestimulación, pero independiente de los niveles de IL7 (32, 33). Así mismo durante la HP rápida, se ha

identificado un incremento de IFN gamma, IL-2 y de marcadores de superficie celular para células CD4 de memoria y células CD8 efectoras (34, 35). La figura 1, describe los dos principales tipo de proliferación.



**Figura 1. Tipos de proliferación homeostática de acuerdo al tiempo de respuesta.**

### 1.3 Efecto de la proliferación homeostática en trasplantes.

Una consecuencia importante de la proliferación homeostática es la conversión de células T naïves a células T con fenotipo de memoria y con actividad citotóxica (36), ó bien, la conversión de células T naïves a células resistentes al bloqueo de las moléculas de coestimulación y con la capacidad para secretar citocinas inflamatorias (por ejemplo, IFN

gamma), en respuesta a la interacción con el receptor de células T de membrana (37-39). Un estudio realizado por *Goldrath y colaboradores*, demostró que la administración de células T naïves en ratones transgénicos con mutaciones en el receptor del linfocito T, convertía transitoriamente a las células T naïves a células de memoria CD44<sup>hi</sup> CD122<sup>lo</sup> Ly6C con características efectoras (37). Posteriormente *Min y colaboradores* evidenciaron la transformación de células T naïves a células de memoria durante la proliferación inducida en ratones neonatos como un mecanismo de autoregulación celular en el periodo posnatal tardío (40). Los hallazgos anteriores demuestran que la proliferación homeostática habitualmente provoca un sesgo hacia células T con fenotipo de memoria, lo que podría ocasionar consecuencias potencialmente adversas para los injertos trasplantados (41-43).

El impacto negativo que la proliferación homeostática podría tener en los injertos, fue evaluado por *Wu y colaboradores*, en un modelo de proliferación homeostática experimental en ratones con inmunodeficiencia combinada severa y sometidos a un trasplante de corazón (8). En este trabajo, los investigadores demostraron favorecer el rechazo agudo y la pérdida del injerto con la administración intravenosa de linfocitos T (proliferación experimental). Así mismo, demostraron como la proliferación inducida limitó el desarrollo de tolerancia inmunológica a pesar del bloqueo de las moléculas de coestimulación (8).

En otro estudio, *Moxam y colaboradores*, demostraron un efecto anti-tolerogénico de la proliferación homeostática en ratones transgénicos sometidos a trasplante renal (7), este efecto fue asociado con un incremento en el número y expresión de células T de memoria (células T de memoria-like). El concepto de células T de memoria-like surgió para definir a las células T de memoria que se originan de la transformación de las células T naïves durante el proceso de proliferación homeostática, diferenciándolas de esta manera de las células T de memoria convencionales (41).

Con base en estos estudios se puede resumir que la evidencia actual muestra que la proliferación homeostática, es un fenómeno inmunológico que de forma experimental se ha asociado con un incremento en el desarrollo de rechazo celular agudo, pérdida del injerto, así como con una mayor dificultad para inducir tolerancia inmunológica (1).

#### **1.4 Historia de la globulina policlonal anti-timocito.**

La primera descripción de una preparación de globulina policlonal anti-timocito fue realizada por *Elie Metchnikoff* en el Instituto Pasteur en 1899, quien por su capacidad para depletar linfocitos *in vitro*, la denominó suero anti-linfocito (ALS) (44). Posteriormente *Chew y Lawrence* en 1937, fueron los primeros en demostrar una reducción *in vivo* de las cifras de linfocitos circulantes, luego de la administración de un suero anti-linfocito de conejo intraperitoneal en conejillos de indias

(45); fenómeno que fue reproducido en ratas por *Cruikshank* en 1941 (46). Por otro lado, otros investigadores demostraron la capacidad de diferentes sueros anti-linfocitos para bloquear reacciones de hipersensibilidad retardada, hallazgos que sugerían el potencial efecto inmunosupresor de los sueros anti-linfocitos (47, 48).

A principios de la década de los sesentas, los investigadores *Woodruff y Anderson*, demostraron incrementar la supervivencia de injertos de piel en ratas albinas con la administración de tres dosis intraperitoneales de ALS (49). La capacidad de los sueros anti-linfocitos para prolongar la supervivencia de injertos de piel fue confirmada y reproducida por otros investigadores y asociada con la depleción de linfocitos obtenida por la administración de ALS (50-53).

Motivados por los resultados obtenidos con los injertos de piel, otros investigadores decidieron conocer el efecto del ALS en un modelo de trasplante renal en perros (54, 55). Los resultados demostraron una adecuada sobrevida del injerto sin incrementar la tasa de infecciones postrasplante (54-57). En 1967, *Mónaco y colaboradores*, fueron los primeros en administrar ALS de conejo a voluntarios humanos sanos, observando con ello una depleción linfocitaria parcial en comparación con los resultados obtenidos con la administración de ALS en roedores y perros (58). Por este motivo, el grupo de *Iwasaki y colaboradores*, decidieron desarrollar un suero anti-linfocito sensibilizando a caballos (59). La evaluación de este nuevo suero demostró mejores resultados en la depleción linfocitaria (59).

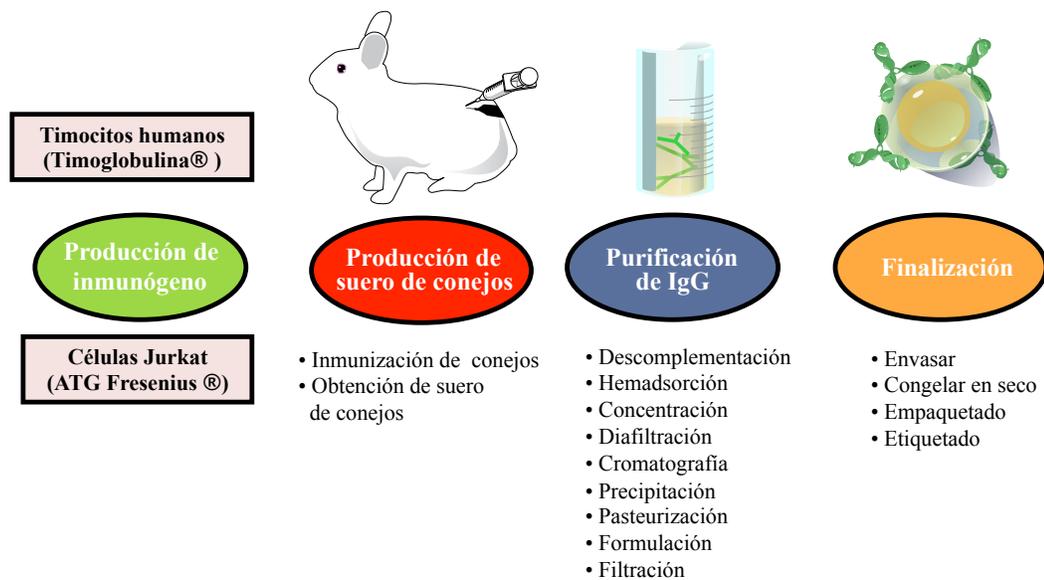
Con la evidencia científica obtenida hasta ese momento, *Starzl y colaboradores* decidieron utilizar un suero ALS de caballo y sensibilizados con timocitos humanos obtenidos de pacientes a quienes se les extirpó el timo, durante una toracotomía realizada por una cirugía de corazón (60). Los resultados de este trabajo permitieron demostrar la utilidad clínica de un suero anti-linfocito para reducir tasa de rechazo agudo y favorecer la sobrevida del injerto (60). Después de estos estudios, numerosos informes en los años setentas y ochentas demostraron los efectos benéficos del suero ALS para incrementar la sobrevida de los injertos en pacientes con trasplante renal (61-64). Sin embargo, con el advenimiento de la ciclosporina (CyA) a principios de los años ochentas, se redujo el uso clínico de los sueros anti-linfocitos a pesar inclusive de haberse demostrado una superioridad clínica en comparación con la administración de CyA (65, 66).

### **1.5 Generación y mecanismos de acción del ATG.**

Desde los trabajos iniciales de Metchnikoff y hasta los años sesentas del siglo XX, la generación del suero anti-linfocito se había logrado por diversas metodologías (3). Sin embargo la técnica más utilizada en la mayoría de los casos fue la obtención de sueros anti-linfocitos a partir de conejos Nueva Zelanda (10).

La técnica consiste en inmunizar a los conejos con linfocitos obtenidos de ganglios linfáticos, bazo o timo de animales donadores (ratas,

ratones, conejillo de indias, etc.). Estos linfocitos posteriormente son administrados de forma intravenosa o intraperitoneal a los conejos (11). Como se muestra en la figura 2, al final esta metodología requiere del sacrificio de los conejos para la obtención del suero, el cual es separado de la sangre, procesado y finalmente utilizado en los animales de estudio (11, 67). Cabe señalar que cuando el suero del conejo se obtuvo por la administración de linfocitos obtenidos del timo (timocitos), el suero anti-linfocito se denomina suero anti-timocito (10, 11).



**Figura 2. Proceso de producción de la globulina policlonal anti-timocito de conejo.**

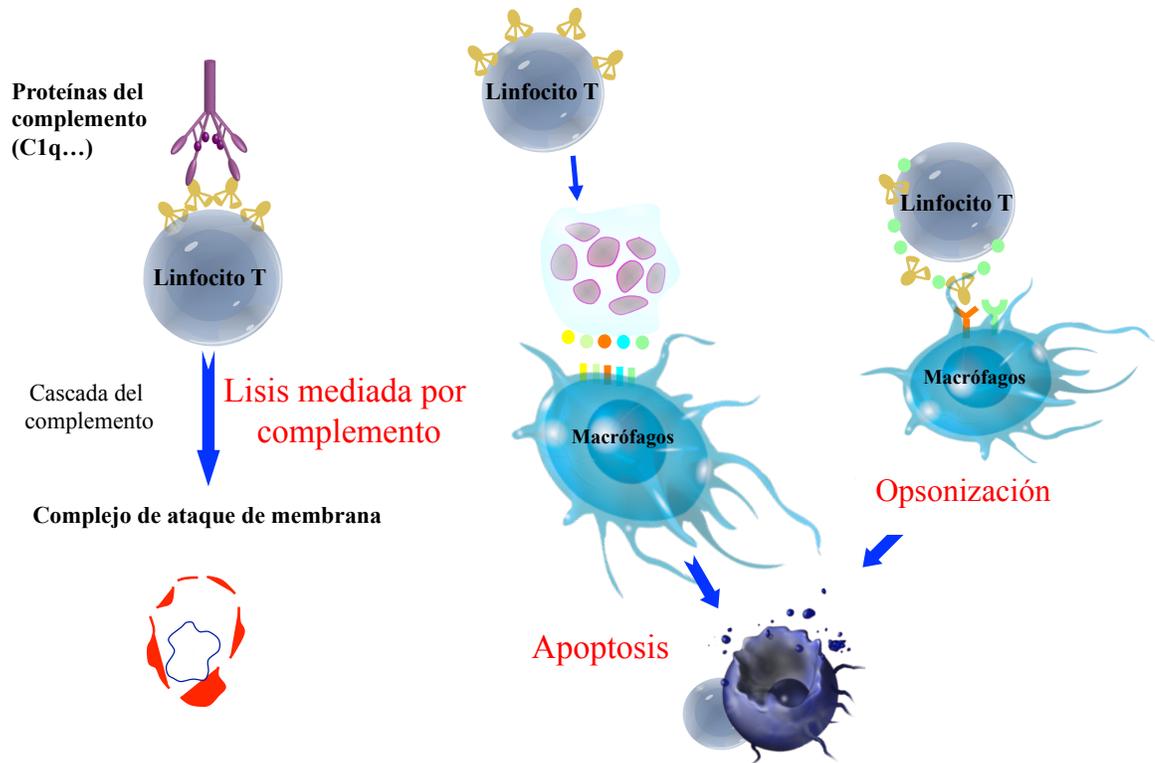
La globulina policlonal anti-timocito, se compone de fracciones de IgG purificadas y obtenidas del suero de conejos, caballos o cabras que fueron previamente sensibilizadas con timocitos específicos de una

cepa animal (10). Unas semanas después de que los conejos fueron sensibilizados, son sacrificados para la obtención del suero total, mismo que deberá ser pasteurizado y purificado para obtener las fracciones de IgG específicas contra linfocitos (12).

A nivel comercial, las preparaciones más utilizadas son la Timoglobulina® y la ATG Fresenius-Biotech®. La primera es una presentación obtenidas de animales sensibilizados con timocitos humanos (12); mientras que la segunda es una preparación obtenida de conejos sensibilizados con células de Jurkat (12, 68).

Respecto al mecanismo de acción del ATG, éste aun no está completamente definido y su efecto en la depleción de linfocitos es proceso de múltiples investigaciones (69-71). Desde su primera descripción se sabe que el ATG es capaz de inducir una depleción de linfocitos (44), sin embargo se han demostrado otros potenciales mecanismos que están directamente relacionados con un potencial efecto inmunomodulador del ATG sobre diversos antígenos de superficie celular (72).

Son tres los principales mecanismos de depleción celular identificados hasta ahora: 1) citotoxicidad directa (73, 74), 2) inducción de apoptosis (75) y 3) mediante opsonización (76). En la figura 3, se muestran los tres principales mecanismos identificados asociados con la depleción de linfocitos por ATG.



**Figura 3. Mecanismo de acción de la globulina policlonal anti-timocito. En rojo se muestran los tres principales mecanismos asociados con la linfodepleción.**

Por el origen policlonal del ATG se puede deducir la existencia de múltiples antígenos diana (15), lo que probablemente podría proporcionar a la ATG diferentes efectos inmunomoduladores que aún no son completamente conocidos (16).

De forma paralela a los estudios de depleción celular, otros investigadores han definido el papel del ATG en la modulación de diferentes moléculas de adhesión y de tráfico celular (72). El antígeno asociado a la función de leucocitos (LFA-1), es una molécula de adhesión intercelular expresado selectivamente en leucocitos (77). Se ha demostrado que dosis bajas de timoglobulina tienen la capacidad

de inducir una expresión a la baja de LFA-1, lo cual, en teoría, podría favorecer una menor migración de los linfocitos al injerto trasplantado y con ello una menor probabilidad de rechazo (78, 79).

Dentro de las preparaciones de anticuerpos identificados en la ATG, también se han identificado anticuerpos contra ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), ICAM-3 (CD50) y para las integrinas (VLA-4, VLA-5 y VLA-6). A pesar de esto, son pocos aún los estudios que han profundizado el potencial impacto clínico que la ATG tendría sobre estos antígenos (79). Un resumen de los principales blancos terapéuticos asociados con la administración de ATG se observa en la tabla 1.

**Tabla 1. Antígenos y moléculas diana asociadas con la administración de ATG.**

Antígenos de membrana	Moléculas de adhesión	Otras moléculas
CD1a	CD11a/CD18 (LFA-1)	CD2
CD3/TCR	CD44	CD5
CD4	CD49/CD29 (VLA-4)	CD6
CD6	CD50 (ICAM-3)	CD11b
CD7	CD51/61	CD29
CD8	CD54 (ICAM-1)	CD38
CD16	CD56	CD40
CD19	CD58 (LFA-3)	CD45
CD20	LPAM-1	CD95
CD25	CD102 (ICAM-2)	CD126
CD28	CD195 (CCR5)	CD138
CD30	CD197 (CCR7)	
CD32	CD184 (CXCR4)	
CD40		
CD80		
CD86		
CD152 (CTLA-4)		
HLA clase I		
HLA clase II		
Beta 2-microglobulina		

tros efectos de la administración de ATG fueron estudiados por *Beiras y colaboradores*, quienes demostraron una disminución significativa del daño isquemia reperfusión secundario a la administración de globulina policlonal anti-timocito (80). Estos hallazgos fueron asociados a una disminución en la expresión de moléculas de adhesión y a una menor infiltración de células inflamatorias, tanto en modelos experimentales en primates no humanos, como en estudios clínicos en pacientes con trasplante de hígado y riñón (81, 82).

Respecto al impacto que la administración de la globulina policlonal anti-timocito pudiera tener en otras poblaciones celulares, se sabe que la ATG induce una marcada apoptosis de células B naïve, células B activadas y células plasmáticas (83-85). Dentro de los potenciales antígenos asociados con esta depleción, se encuentran CD30, CD38, CD95, CD80 y HLA-DR, con los cuales la ATG pudiera estar interactuando (83). El mecanismo molecular identificado en el proceso de apoptosis de las células B, fue determinado por *Zand y colaboradores*, quienes en cultivos celulares demostraron la capacidad de la ATG para inhibir la vía de las caspasas y la activación de la apoptosis dependiente de catepsina (84).

Otros investigadores han evaluado el efecto de la ATG sobre células tipo NK (86). Las células tipo NK tienen un rol fundamental en la iniciación de la respuesta inmunológica, debido a que se encuentran asociadas con la activación de linfocitos T y la liberación de

interleucina 4 e interferón gamma (87, 88). Respecto al efecto que la ATG tendría sobre las células dendríticas, *Monti y colaboradores* determinaron la capacidad de la ATG para producir lisis de células dendríticas maduras y bloquear la estimulación con los linfocitos T (89). Así mismo, *Giller-Hladky y colaboradores*, en experimentos realizados in vitro demostraron la capacidad de la ATG para inhibir la maduración de las células dendríticas derivadas de los monocitos y con ello favorecer la generación de células dendríticas tolerogénicas ILT-3, CD123, CCR6, productoras de interferón alfa (supresor de células TH1), luego de incrementar la expresión del RNA mensajero de la indolamina 2,3-deoxigenasa, cuya traducción proteica ha sido fuertemente vinculada con la inhibición de la proliferación de linfocitos T (90, 91). Aunque que estos hallazgos han sido in vitro, sus implicaciones clínicas no han sido completamente analizadas, pero este efecto sugiere la probabilidad de la ATG para modular la respuesta de la inmunidad innata (92).

En resumen, podemos señalar que la ATG es capaz de inducir una depleción celular, resultado de un amplio espectro de anticuerpos policlonales y mediante tres mecanismos principales de acción: 1) inducción de apoptosis por citotoxicidad directa, 2) lisis mediada por complemento y 3) opsonización. Sin embargo, el agotamiento de los linfocitos T no parece ser el único mecanismo de acción que tiene la ATG, debido, a que se han identificado otros potenciales mecanismos directamente relacionados con la modulación en la

expresión de antígenos de superficie celular y de proteínas de migración celular que permiten suponer una potencial participación de la ATG en la respuesta inmunológica de pacientes trasplantados (1, 9, 13, 92, 93 y 94).

### **1.6 Caracterización de la proliferación homeostática inducida por la ATG.**

La primera descripción de la proliferación homeostática inducida por la ATG fue realizada por *Preville y colaboradores* (17). Ellos evaluaron en un modelo de trasplante de piel y de corazón en monos *Cynomolgus*, el impacto de la administración de tres dosis distintas de ATG (dosis baja 1 mg/kg; dosis alta 5 mg/kg y dosis muy alta 20 mg/kg), en la proliferación homeostática de linfocitos T. Sus hallazgos documentaron una depleción de las células CD2, CD3, CD4 y CD8, directamente proporcional a la dosis de ATG, excepto para los linfocitos del timo, esto último, ellos lo asociaron a un probable acceso farmacocinético limitado de la ATG para alcanzar este órgano. Así mismo, ellos documentaron una marcada supervivencia del injerto dependiente de la dosis, incluso a pesar de un rápido aclaramiento de los títulos séricos de ATG (17). En la misma línea, *Ruzek y colaboradores* reportaron el efecto de una dosis intraperitoneal de ATG en la depleción de células de bazo, sangre periférica, ganglios linfáticos y médula ósea de ratones sanos (18). Ellos documentaron una reducción significativa de las cifras de

linfocitos CD4, CD8, células naives, células de memoria y células T reguladoras, con una subsecuente re-población celular (18).

Un trabajo que marcó el rumbo de los estudios de la proliferación homeostática, fue el realizado por *López y colaboradores* quienes en cultivos de linfocitos obtenidos de sangre periférica de donadores voluntarios sanos, reportaron la capacidad de la ATG para generar una mayor expresión de células CD4+CD25+Foxp3+ (19). El trabajo de la Dra. Marta López, asoció el incremento de las células T reguladoras a una mayor conversión de células CD4+CD25- a células CD4+CD25+, sobre una proliferación de las células CD4+CD25+ naturales (19). Un hallazgo interesante de este trabajo fue descubrir que las células T reguladoras inducidas por la ATG, conservaron la capacidad de suprimir la respuesta antígeno-específica pero incapaces de suprimir la respuesta inmunológica mediada por las células de memoria (19). Estos resultados permitieron sugerir la posibilidad de utilizar a la ATG como un fármaco inductor de tolerancia inmunológica al incrementar el número de células T reguladoras en pacientes receptores de aloinjertos (9, 13). Sin embargo, un trabajo al que se le deberá de poner importante atención, fueron los resultados publicados por *Sener y colaboradores*, quienes demostraron la transformación de células T naïves a células T de memoria (memoria-like) durante la proliferación homeostática de ratones tratados con ATG (38), debido

a que la presencia de células T de memoria potencialmente favorecería el desarrollo el rechazo a los injertos (37). Por este motivo, los posibles efectos tolerogénicos de la ATG deberán de ponerse en una balanza entre sus acciones pro-tolerogénicas (incremento de células T reguladoras y células dendríticas tolerogénicas) y la posible inducción de células de memoria efectoras.

### **1.7 Evaluación clínica de la administración de ATG en receptores de trasplante renal.**

Los anticuerpos policlonales son utilizados ampliamente en la práctica clínica y a diferencia de los anticuerpos monoclonales son agentes biológicos con varios potenciales mecanismos de acción tal y como se ha descrito previamente (12, 15, 16). La globulina policlonal anti-timocito (ATG), es un anticuerpo policlonal utilizado en la práctica clínica desde hace mas de tres décadas (11). Las aplicaciones clínicas actuales para la administración de ATG son el tratamiento de la anemia aplásica, la prevención y tratamiento de rechazo del injerto y en el manejo de pacientes con enfermedad injerto contra huésped (10, 65).

La administración de ATG en receptores de trasplante renal fue realizado por primera vez a finales de la década de los sesentas (60). Posteriormente, su uso se extendió en algunos grupos de trasplantes reconocidos (61-64). Sin embargo, fueron *Taylor y colaboradores* en

Canadá quienes realizaron el primer ensayo clínico controlado multicéntrico, para evaluar la eficacia y seguridad de la administración de ATG de caballo en pacientes receptores de trasplante renal (62). Los resultados de este trabajo permitieron demostrar el impacto positivo que la administración de dosis altas de ATG (20 mg/kg/día por 10 días), tuvieron para reducir la tasa de rechazo agudo y mejorar la sobrevida del injerto (62). Sin embargo, con el advenimiento de la ciclosporina a principios de los años ochentas como fármaco inmunosupresor, las aplicaciones clínicas de la ATG disminuyeron en la mayor parte de los centros de trasplantes del mundo, limitando su administración a pacientes con rechazo agudo resistente a esteroides o como terapia de inducción pre-trasplante en pacientes con alto riesgo inmunológico (95-97). Entre los argumentos que limitaron el uso del ATG fueron el potencial incremento en el desarrollo de infecciones graves y de la enfermedad linfoproliferativa del trasplante (98, 99). Sin embargo, a principios de los años noventas, el grupo del Dr. Grinyo en Barcelona, demostró la eficacia de administrar un triple esquema inmunosupresor con ATG, dosis baja de ciclosporina y dosis bajas de esteroide, favoreciendo con ello la sobrevida de los pacientes y del injerto, pero sin incrementar el riesgo infecciones graves (100).

Hasta los años noventas la mayor parte de los estudios clínicos eran realizados con ATG obtenido de sueros de caballos, sin embargo, el desarrollo comercial de una ATG obtenida de sueros de conejos,

permitió al grupo del Dr. Brennan desarrollar el primer ensayo clínico controlado, doble ciego y aleatorizado, comparando dos esquemas de inducción pre-trasplante con las dos preparaciones comerciales de ATG conocidas: ATG obtenida de sueros de caballos (Atgam ®) versus ATG obtenida de sueros de conejos (Timoglobulina ®). El resultado de este trabajo reveló una superioridad clínica de la Timoglobulina ® sobre los pacientes que recibieron Atgam ® para reducir la tasa de rechazo renal, pérdida del injerto, con un menor porcentaje de infecciones por citomegalovirus (101). A partir de entonces, el número de estudios clínicos utilizando inducción con ATG obtenida de sueros de conejo en receptores de trasplante renal se incrementaron significativamente (102-108). Con estos estudios se ha demostrado que la terapia de inducción con ATG versus basiliximab (un anticuerpo monoclonal en contra del receptor de interleucina 2), reduce significativamente los episodios de rechazo agudo y retardo en la función del injerto en pacientes con alto riesgo inmunológico (102). Mientras que el uso de la ATG en pacientes receptores de donante vivo permitió el retiro temprano de los esteroides (103, 104). Así mismo la administración de la ATG disminuyó el retardo de la función del injerto en pacientes con injerto provenientes de donadores fallecidos (105). Además se demostró la eficacia de la administración de la ATG para incrementar la supervivencia del injerto en pacientes considerados de alto riesgo inmunológico (106). El beneficio de la administración de la ATG también ha sido

demostrado en pacientes pediátricos, en donde *Kamel y colaboradores* demostraron la seguridad de la administración de la ATG en niños, para favorecer la sobrevida del injerto, sin incrementar el desarrollo de infecciones graves o de enfermedad linfoproliferativa del injerto (107). Sin embargo, una de las líneas de investigación clínica en trasplantes ha sido definir la eficacia y seguridad de la dosis de administración de la ATG como terapia de inducción en receptores de trasplante renal (10). Estudios han demostrado, que el uso de altas dosis de ATG (7-10 mg/kg/total), favorecieron las complicaciones infecciosas postrasplante (108), mientras que el uso de bajas dosis ATG (< 5 mg/kg/total) fueron suficientes para disminuir la tasa de rechazo agudo y mejorar la sobrevida del injerto (109-111). Esto ha permitido establecer terapias de inducción farmacológicas de mayor seguridad y eficacia para los pacientes candidatos a trasplante renal (10, 11).

Otros estudios clínicos dirigidos por la Dra. Carla Baan en Holanda, han evaluado la eficacia clínica de la administración de ATG en la proliferación homeostática de células T reguladoras, primero en pacientes receptores de trasplante renal (23) y posteriormente en pacientes con enfermedad renal crónica avanzada (24). En el primer estudio, ellos demostraron como los linfocitos T CD25<sup>bright</sup> inducidos por ATG lograron conservar la capacidad de suprimir la proliferación celular de cultivos estimulados con antígenos donante-específico y por terceros antígenos (23). Mientras que en el segundo trabajo, se

demonstró la capacidad de inducir células T reguladoras obtenidas de linfocitos de sangre periférica de donadores voluntarios con enfermedad renal crónica avanzada (24). Ellos demostraron que las células T reguladoras inducidas por ATG, eran capaces de inhibir la respuesta alogénica de las células T efectoras, aumentando la expresión de interleucina-10, interleucina-27, interferón gamma, granzima B y perforina en comparación con las células T reguladoras naturales (24). De forma paralela al grupo de la Dra. Carla Baan, se publicaron dos trabajos clínicos, en los cuales se demostró la capacidad de la terapia de inducción con ATG para incrementar el número de células T reguladoras en sangre periférica de pacientes receptores de trasplante renal (22, 111, 112).

En la misma línea, *Bestard y colaboradores*, demostraron, como la terapia de inducción con bajas dosis de ATG y rapamicina, se asociaron con una menor incidencia de rechazo agudo y de forma interesante observaron la capacidad de este esquema inmunosupresor para transformar la respuesta inmunológica de los pacientes a “hiporespondedores” a estímulos donante específicos y a terceros antígenos (113). Así mismo, ellos documentaron que los pacientes hiporespondedores donante específicos, presentaron una mejor función renal, con un menor porcentaje de nefropatía crónica del injerto, ambos hallazgos fueron asociados con un incremento en la expresión histológica de células CD4+CD25<sup>high</sup>Foxp3+ en el injerto de los pacientes con ATG y rapamicina (113).

Con base en todo lo anterior y de acuerdo con los estudios de laboratorio en los que se demostraba que dosis bajas de ATG favorecían la proliferación de células T reguladoras, es que actualmente, se considera que la administración de ATG, además de favorecer una adecuada supervivencia del injerto, también, podría tener un importante papel en el desarrollo de tolerancia inmunológica (11, 12, 13).

En el presente trabajo de tesis nosotros nos planteamos conocer el efecto que la administración de una terapia de inducción con ATG tiene en un modelo experimental de proliferación homeostática. Para cumplir lo anterior, primero desarrollamos una ATG específica para rata Wistar, posteriormente evaluamos los efectos *in vitro* del ATG en cultivos de linfocitos T. Subsecuentemente, estudiamos y caracterizamos con diferentes dosis intravenosas de ATG la proliferación homeostática de las subpoblaciones de linfocitos T obtenidas de sangre periférica. Finalmente evaluamos, la capacidad funcional de las células T reguladoras inducidas por la ATG, en un modelo experimental de trasplante renal no singénico.

## **II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La proliferación homeostática favorece el rechazo agudo y la pérdida de los injertos al transformar las células T naïves a células T de memoria con actividad citotóxica. La globulina policlonal anti-timocito (ATG) es un fármaco utilizado como terapia de inducción en el trasplante de órganos. Estudios han demostrado que dosis bajas de ATG favorece la inducción de células T reguladoras CD4+CD25+Foxp3+ (Tregs), sin embargo, otros estudios han revelado que la administración de ATG favorece la expresión de células T de memoria con características efectoras. Por lo anterior, no se conoce completamente, cual es el efecto de la proliferación homeostática inducida por la administración de una terapia de inducción con ATG en el trasplante de riñón.

## **III. PREGUNTAS DE INVESTIGACION**

- 3.5 ¿Cuál es el efecto de la globulina policlonal antitimocito en la proliferación homeostática experimental del linfocito T?
- 3.6 ¿Cuál es la capacidad funcional las células T reguladoras inducidas por rATG?
- 3.7 ¿Existe una asociación de la terapia de inducción con rATG con la expresión de células T reguladoras y células T de memoria efectoras?
- 3.8 ¿Cuál es el impacto de la proliferación homeostática inducida por la rATG en la función del injerto renal no singénico?

#### **IV. JUSTIFICACION**

El trasplante renal constituye el tratamiento de elección en el manejo de los pacientes con enfermedad renal crónica avanzada. A pesar de la generación de nuevos fármacos inmunosupresores, las tasas de pérdida del injerto asociadas con el rechazo agudo son elevadas. La proliferación homeostática es un fenómeno de re-población celular asociado con el desarrollo de rechazo y pérdida del injerto. La globulina policlonal anti-timocito (ATG) es un fármaco utilizado como terapia de inducción en el trasplante de órganos. A pesar de que la depleción con dosis bajas de ATG induce favorece la inducción de células T reguladoras también también se ha demostrado que ATG es capaz de inducir células T de memoria efectoras. Por esta razón, el estudio y caracterización de la proliferación homeostática permitirá definir el fenotipo de la re-población celular inducido por la ATG con el objetivo de desarrollar mejores esquemas de inmunosupresión que reduzcan la pérdida de los injertos y favorezcan el desarrollo de tolerancia inmunológica.

## **V. HIPOTESIS**

La administración de globulina policlonal anti-timocito de conejo anti rata, modula la proliferación homeostática del linfocito T hacia una mayor expresión de células T reguladoras y una prevención de rechazo celular agudo en el injerto renal.

## **VI. OBJETIVOS**

### **1. Objetivo principal:**

Caracterizar la proliferación homeostática inducida por la administración de la globulina policlonal anti-timocito de conejo en ratas Wistar de las subpoblaciones de células T.

### **2. Objetivos específicos:**

2.1 Desarrollar una ATG de conejo específica anti-rata Wistar

2.2 Evaluar la unión del rATG a linfocitos CD3+ obtenidos de timocitos, esplenocitos y células PMBC de ratas Wistar.

2.3 Conocer la capacidad del rATG para producir apoptosis *in vitro* en timocitos CD3+ obtenidos de ratas Wistar.

2.4 Caracterizar la proliferación homeostática de subpoblaciones de células T inducidas por la administración intravenosa de distintas dosis de rATG en ratas Wistar.

2.5 Determinar la capacidad funcional de las células T reguladoras inducidas por rATG en cultivos mixtos alogénicos.

2.6 Evaluar el impacto funcional de la proliferación homeostática inducida por rATG en un modelo experimental de trasplante renal.

## VII. MATERIALES Y METODOS

### 1.1 Animales y diseño experimental.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar entre 250 y 350 gramos de peso (Charles River, Harlan UK Limited) y conejos blancos de Nueva Zelanda mayores de 2.5 kg (Charles River, Harlan UK Limited). Los animales fueron cuidados de acuerdo con las Guías del Comité de Cuidados y Uso de Animales de Laboratorio, así como con las Guías de las Buenas Prácticas de Laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Bellvitge, Barcelona, España. Así mismo se siguieron las recomendaciones emitidas por la FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations). Los conejos fueron utilizados para la obtención del ATG, previa sensibilización con timocitos de ratas Wistar. Para el estudio de los efectos del ATG in vitro e in vivo, se utilizaron ratas macho Wistar. Para el modelo de trasplante renal se utilizaron ratas macho Wistar como donador y como receptor renal.

El diseño experimental se desarrollo en cinco fases. **(A)** Primero, desarrollamos una ATG de conejo, específica para ratas Wistar. **(B)** Segundo, evaluamos la afinidad de nuestro ATG en ensayos de unión con poblaciones de células CD3+ obtenidas de PBMC, timo y bazo de ratas Wistar. Posteriormente, analizamos los efectos pro-apoptóticos de diferentes dosis de ATG (0, 10, 50, 100 y 250 mcg/ml) en cultivos con células CD3+ obtenidas de PBMC de ratas Wistar. **(C)** Tercero, desarrollamos un modelo de proliferación homeostática experimental

con la administración intravenosa de diferentes dosis de ATG (2.5, 5, 10 y 20 mg/kg de peso seco) en ratas Wistar. Adicionalmente, evaluamos la proliferación de las células T reguladoras mediante ensayos de incorporación de BrdU administrado de forma intraperitoneal a las ratas. **(D)** Cuarto, en cultivos mixtos se evaluó la capacidad funcional de las células T reguladoras obtenidas de PBMC de ratas trasplantadas y previamente tratadas con una dosis intravenosa de ATG. **(E)** Finalmente, se analizó el impacto funcional de la administración de nuestra ATG en un modelo experimental de trasplante renal no singénico.

### **1.2 Generación de la globulina policlonal anti-timocito de conejo específica para rata Wistar.**

Brevemente, los conejos fueron inmunizados con la administración intravenosa de una mezcla de  $1 \times 10^6$  timocitos/mL obtenidos de ratas Wistar no tratadas. Los timocitos se obtuvieron de ratas macho Wistar donadoras. Cincuenta conejos fueron sensibilizados en cuatro ocasiones cada semana durante cuatro semanas. Al término del seguimiento los conejos fueron sacrificados y se obtuvo el suero, mediante la extracción de sangre por punción cardíaca. El suero de los conejos fue procesado mediante la técnica de purificación similar a la utilizada para la generación comercial de ATG<sup>®</sup> (Fresenius Biotech, Germany). Así mismo, sueros de conejos no inmunizados, fueron

purificados y procesados, para obtener anticuerpos IgG no específicos, mismos que fueron utilizados para los ensayos control (Isotipo de IgG).

### **1.3 Caracterización fenotípica y separación de células.**

El análisis por citometría de flujo fue realizado utilizando un equipo FACS Canto™ II system (BD Bioscience, San Jose, CA) y utilizando una combinación de anticuerpos directamente conjugados a isotiocinato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), alofococianina (APC) o a la proteína peridin clorofila (PerCP). El análisis de citometría de flujo fue realizado con al menos 100,000 eventos contabilizados por muestra. Los siguientes anticuerpos monoclonales de rata fueron utilizados: Cocktail T/B/NK (APC-conjugado CD3, FITC-conjugado CD45RA y PE-conjugado CD161a) y PE-conjugado CD45RC (BD Pharmingen, San Diego, CA), así como PE-conjugado Foxp3, FITC-conjugado CD45R, FITC-conjugado CD4, APC-conjugado CD25, y PE-conjugado CD3 (eBioscience, San Diego, CA) (115-118). Las tinciones extracelulares fueron realizadas antes de las tinciones intracelulares a 4°C por 30 minutos. La tinción intracelular para Foxp3+ fue realizada de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial (eBioscience) (118).

### **1.4 Ensayos de unión farmacológica.**

Para evaluar la unión de nuestra ATG de conejo específica para rata Wistar, utilizamos  $10^6$  células marcadas con CD3+ y obtenidas de PBMC, timocitos, y esplenocitos en una solución de 1 mL de PBS. Las

células fueron incubadas con una dosis de 10 mcg/mL de ATG por 30 min a 4°C, y posteriormente fueron lavados con PBS y subsecuentemente marcados con anti-rIgG-PE (eBioscience); este anticuerpo mostró una afinidad de unión similar a la de IgG obtenida por su fabricante (3,5 y 3,7 moles con FITC e IgG, respectivamente). Todas las células descritas anteriormente fueron marcadas con PerCP-CD3 conjugado y específico para rata y posteriormente evaluado por citometría de flujo.

### **1.5 Cultivos celulares y evaluación de la apoptosis.**

Un total de  $10^6$  células marcadas con CD3+ y obtenidas de PBMC, timocitos o esplenocitos, fueron co-cultivados con diferentes dosis de rATG, en RPMI 1640 y estreptomicina. La cuantificación de la apoptosis se realizó al tiempo cero, a las 2, 24 y 48 horas de la exposición al rATG. Los cultivos fueron suplementados con 10% de suero bovino inactivado con calor e incubados a 37°C, con 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. Adicionalmente, el crecimiento de los cultivos fue evaluado en presencia o ausencia de factores de complemento (suero específico de rata). Para evaluar el grado de apoptosis, las células fueron marcadas con anexina V-PE (BD Biosciences) y cuantificada por FACS. La necrosis fue definida con marcación específica para 7-actinomicina D (7-AAD), misma que se agregó 10 minutos antes de su cuantificación. El porcentaje de muerte celular también se observó por microscopía óptica y tinción con azul de tripán.

### **1.6 Ensayos de proliferación celular utilizando BrdU.**

Previo a cada experimento, las ratas se sometieron por tres días consecutivos a la administración intraperitoneal de 100 mg/kg de BrdU (BD Biosciences). Los ensayos de proliferación fueron realizados de acuerdo con las recomendaciones del protocolo de proliferación comercial (BD Biosciences) (119).

### **1.7 Modelo de trasplante renal y terapia de inducción con ATG.**

Para el trasplante renal una rata Wistar sirvió como donadora de riñón y una rata Wistar sirvió como receptora del injerto. Las ratas Wistar son animales no consanguíneos con un coeficiente de endocría  $F$  menor a 10% y con una homogeneidad genética muy baja (120-122). Las ratas Wistar por su alta variabilidad genética tienen una alta probabilidad para desarrollar rechazo a los injertos (123), por que el trasplante renal entre ratas Wistar es considerado como un trasplante no singénico (124). Todos los trasplantes fueron realizados bajo condiciones de dos horas de isquemia fría a 4°C y utilizando solución de preservación tipo Celsior (Genzyme, Corporation Cambridge, MA). La técnica quirúrgica se puede revisar en el siguiente vínculo de internet [www.renal-transplantation.com](http://www.renal-transplantation.com), tal y como ha sido publicada previamente (125).

## **1.8 Protocolo de cuidado y seguimiento postrasplante renal**

Después de la cirugía los animales fueron cuidados y vigilados mediante el protocolo de seguimiento postrasplante que se muestra a continuación:

### **A) Observación de parámetros:**

#### **1. Aspecto**

Pelaje en mal estado: 1 punto

Secreciones oculares y/o nasales: 1 punto

Postura relajada en decúbito prono: 5 puntos

#### **2. Conducta**

Normal: 0 puntos

Apatía e inmovilidad: 2 puntos

Irritabilidad e hiperactividad: 2 puntos

#### **3. Peso**

Ganancia peso a las 24h post-trasplante: 2 puntos

Pérdida >20% más allá de 48h post-trasplante: 5 puntos

### **B) Aplicación de medidas correctoras: Suma de puntos**

0 puntos: No se aplica medida correctora

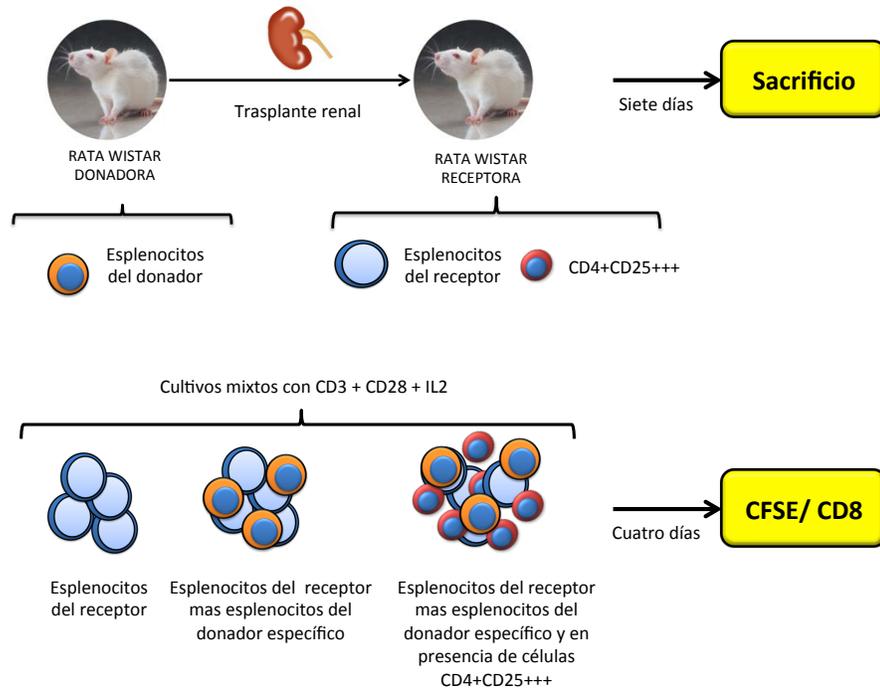
1 punto: Observar resto de parámetros

2 a 4 puntos: Administrar 1 dosis analgésica

5 puntos o más: Sacrificio

## **1.9 Ensayos funcionales de supresión *ex-vivo***

Los ensayos de proliferación fueron realizados utilizando un marcaje con CFSE (Invitrogen, UK) y cuantificado la proliferación de las células efectoras CD8+CFSE+. Se utilizaron  $10^6$  esplenocitos obtenidos de ratas trasplantadas “células respondedoras” y marcados con CFSE. Posteriormente estas células fueron cultivadas con esplenocitos depletados de células CD3+ y obtenidos de la misma rata donadora “células estimuladoras” (estimulo donante específico) depletados de CD3+ vía sorter. Los cultivos mixtos de esplenocitos fueron realizados en ausencia o presencia de células T reguladoras CD4+CD25+++ en relación 1:1. Las células CD4+CD25+++ fueron aisladas por citometría de flujo utilizando un equipo MoFlo<sup>®</sup> (Beckman Coulter, USA) y obtenidas de las PBMC de las ratas trasplantadas. Todos los cultivos celulares fueron estimulados con 1 mcg/mL de anti-CD3 y 1 mcg/mL de anti-CD28 (eBiosciences) y seguidos hasta el cuarto día. Posteriormente, las células fueron lavadas y marcadas para CFSE para luego ser analizadas vía FACS. La capacidad de supresión de las células T reguladoras se cuantificó de acuerdo con la capacidad relativa para inhibir la proliferación de las células CD8+CFSE+ (126). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. El esquema de la metodología utilizada para realizar estos ensayos de supresión se muestra en la figura 4.



**Figura 4. Ensayo de supresión utilizado para evaluar el posible efecto supresor de las células  $CD4^+CD25^{++}$  obtenidas de ratas tratadas con ATG.** Los cultivos mixtos fueron estimulados con IL2, anti-CD3 y anti-CD28. En la parte inferior izquierda se muestran los esplenocitos obtenidos de la rata (célula respondedora). En la parte central se muestran los cultivos de esplenocitos utilizando una mezcla de esplenocitos de rata receptora y esplenocitos depletados de  $CD3^+$  de la rata donadora específica (célula estimuladora). En la parte inferior derecha se muestra el cultivo con los esplenocitos donador específico y las células T reguladoras en relación 1:1. Todos los cultivos se siguieron por 4 días y al final se marcó la proliferación de células  $CD8^+$  con  $CFSE^+$ .

### 1.10 Análisis estadístico

Se utilizó estadística paramétrica o no paramétrica dependiendo de la distribución de variables. Se aplicó prueba T de Student o prueba de Wilcoxon no pareada así como prueba de U de Mann-Whitney *U* de acuerdo a la distribución de normalidad. Se consideró como estadísticamente significativo un valor de *p* menor de 0.05 bimarginal. Los datos fueron expresados en promedio y desviación estándar o porcentajes.

## VIII. DEFINICION OPERACIONAL DE VARIABLES

Variable	Concepto	Escala
Proliferación homeostática	Fenómeno de repoblación celular que aparece posterior a un estado de depleción celular y que tiene como objetivo mantener la homeostasis en el número de células del sistema inmunológico	Continua
Globulina policlonal anti-timocito	Anticuerpos obtenidos habitualmente de sueros de conejos previamente inmunizados con linfocitos obtenidos de timo, ganglios linfáticos, bazo o células mononucleares de sangre periférica de un animal en particular.	Bivariado
Células T reguladoras	Fenotipo celular de linfocito T, caracterizado por la expresión de proteínas CD4+CD25++Foxp3+ y que muestra una capacidad de suprimir la actividad funcional de las células T efectoras.	Continua
Células T de memoria	Fenotipo celular de linfocitos T que presentan una capacidad “programada” para activar una respuesta inmunológica antígeno-específica.	Continua
Células T naïves	Fenotipo celular de linfocitos T maduros y que aún no muestra una actividad específica para un antígeno en particular.	Continua
Células T efectoras	Fenotipo celular de linfocito T que presenta una capacidad funcional inmunitaria, caracterizada por la liberación de citocinas o por citotoxicidad directa.	Continua

## IX. RESULTADOS

### 1. Generación de una ATG específica de rata Wistar

Cuarenta conejos fueron inmunizados con timocitos obtenidos de ratas Wistar. Al inicio cada conejo recibió  $1 \times 10^6$  timocitos/mL de forma intravenosa, posteriormente, cada conejo recibió  $1 \times 10^6$  timocitos/mL, los días 14, 28 y 40 de forma subcutánea. Al final del seguimiento los conejos fueron sacrificados mediante una extracción de sangre total por punción cardíaca. El suero fue aislado y procesado para obtener un suero inmune con una concentración de anticuerpos anti-timocitos de 100 mg/mL y un suero no inmune este último obtenidos de conejos no sensibilizados de 50 mg/mL (figura 5)

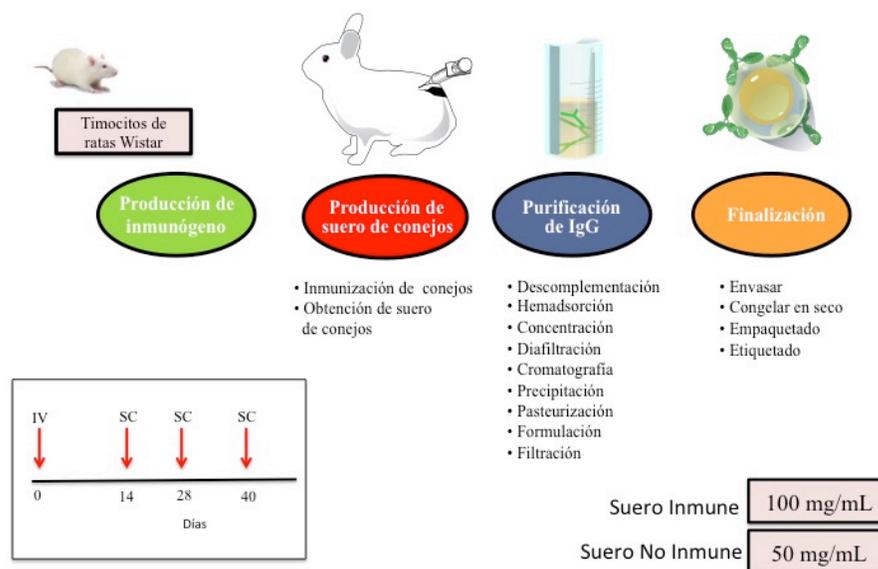
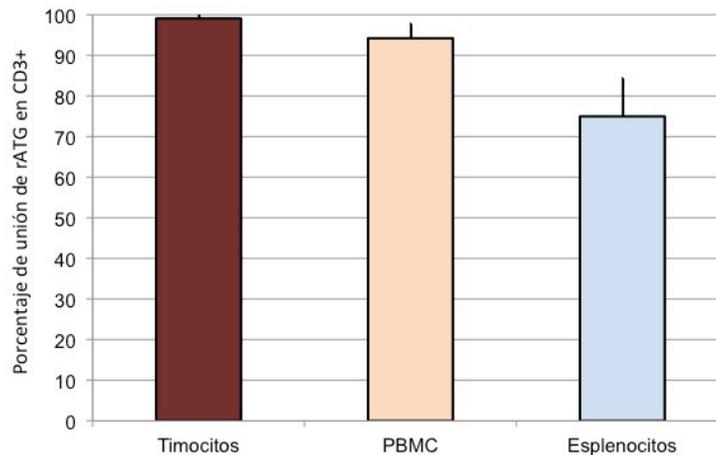


Figura 5. Protocolo utilizado para la obtención de suero anti-timocito de conejo contra rata Wistar.

## 2. ATG se une eficazmente a los timocitos, PBMC y esplenocitos e induce una adecuada apoptosis celular in vitro.

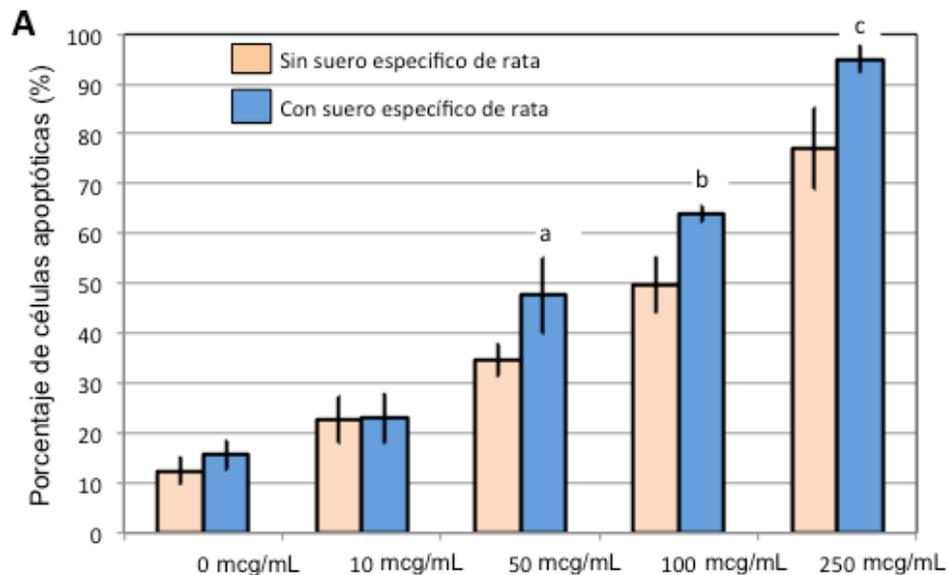
Los ensayos de unión demostraron que el  $99 \pm 0,01\%$  de los timocitos,  $98 \pm 0,05\%$  de las PBMC y el  $75 \pm 7,5\%$  de los esplenocitos, se unieron de manera eficaz a nuestra rATG (**figura 6**). La saturación máxima persistió durante al menos 24 horas. Durante la incubación de los cultivos, no se encontró uniones en ausencia de anticuerpo (medio solo) o en presencia de anticuerpo IgG control (Isotipo IgG).



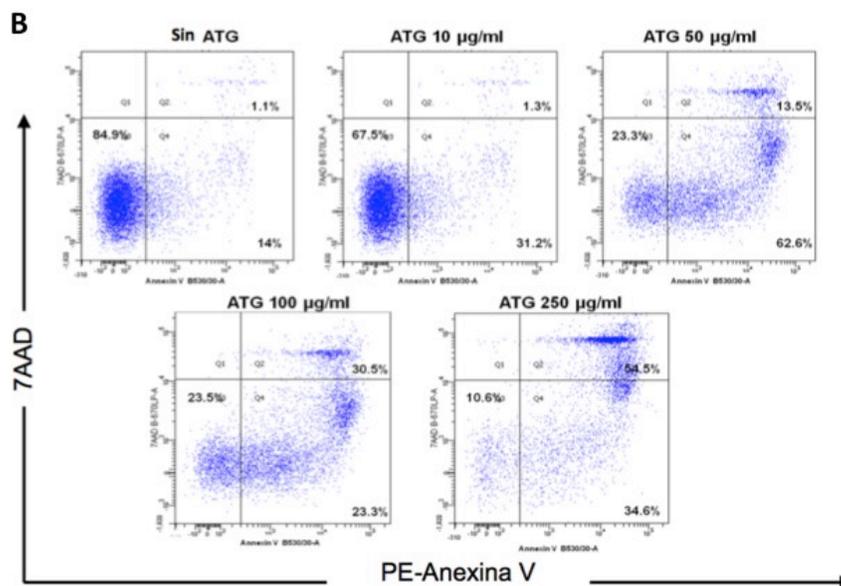
**FIGURA 6. Ensayo de unión de la globulina policlonal anti-timocito de conejo anti-rata.** Se muestra el porcentaje de unión entre la rATG y las células CD3+ obtenidas de timocitos (izquierda), PBMC (centro) y esplenocitos (derecha).  $10^6$  células CD3+ fueron incubadas con  $10 \mu\text{g/mL}$  de rATG por 30 min a  $4^\circ\text{C}$  y posteriormente marcados con anti-rIgG-PE y PerCP-CD3 conjugado.

En la **figura 7A**, se muestra el grado de apoptosis celular después de 2 horas de cultivar timocitos CD3+ con diferentes concentraciones de rATG. Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre la

presencia (barras oscuras) y la ausencia (barras blancas) de suero específico para rata (proteínas del complemento) a partir de células CD3+ cultivadas con 50 µg/ml (a= 38% vs. 48%, p< 0,05 ), 100 µg/ml (b= 49% vs. 62 %, p< 0,01) y 250 µg/ml (C= 76% vs. 93%, p< 0,001) de rATG. Estos resultados permiten demostrar el efecto de las proteínas del complemento en el mecanismo de acción de ATG. La **figura 7B** muestra los paneles de FACS representativos de los diferentes efectos apoptóticos de la rATG, en un experimento específico con diferentes concentraciones de rATG luego de dos horas de cultivo.



**FIGURA 7. Apoptosis In vitro de células CD3+ utilizando diferentes dosis de globulina policlonal anti-timocito de conejo anti-rata.** (A) Porcentaje de apoptosis celular luego de dos horas de cultivo de timocitos CD3+. Las barras en castaño muestran el porcentaje de células apoptóticas asociadas con dosis crecientes de rATG. Las barras en azul muestran los cultivos de timocitos CD3+ con diferentes dosis de rATG con un porcentaje más alto de apoptosis cuando se agrega suero específico de rata (proteínas de complemento). La comparación de cultivos mostro diferencia estadística significativa con dosis de 50 hasta 250 µg/mL (a= p<0.05; b= p<0.01; y c= p<0.001).

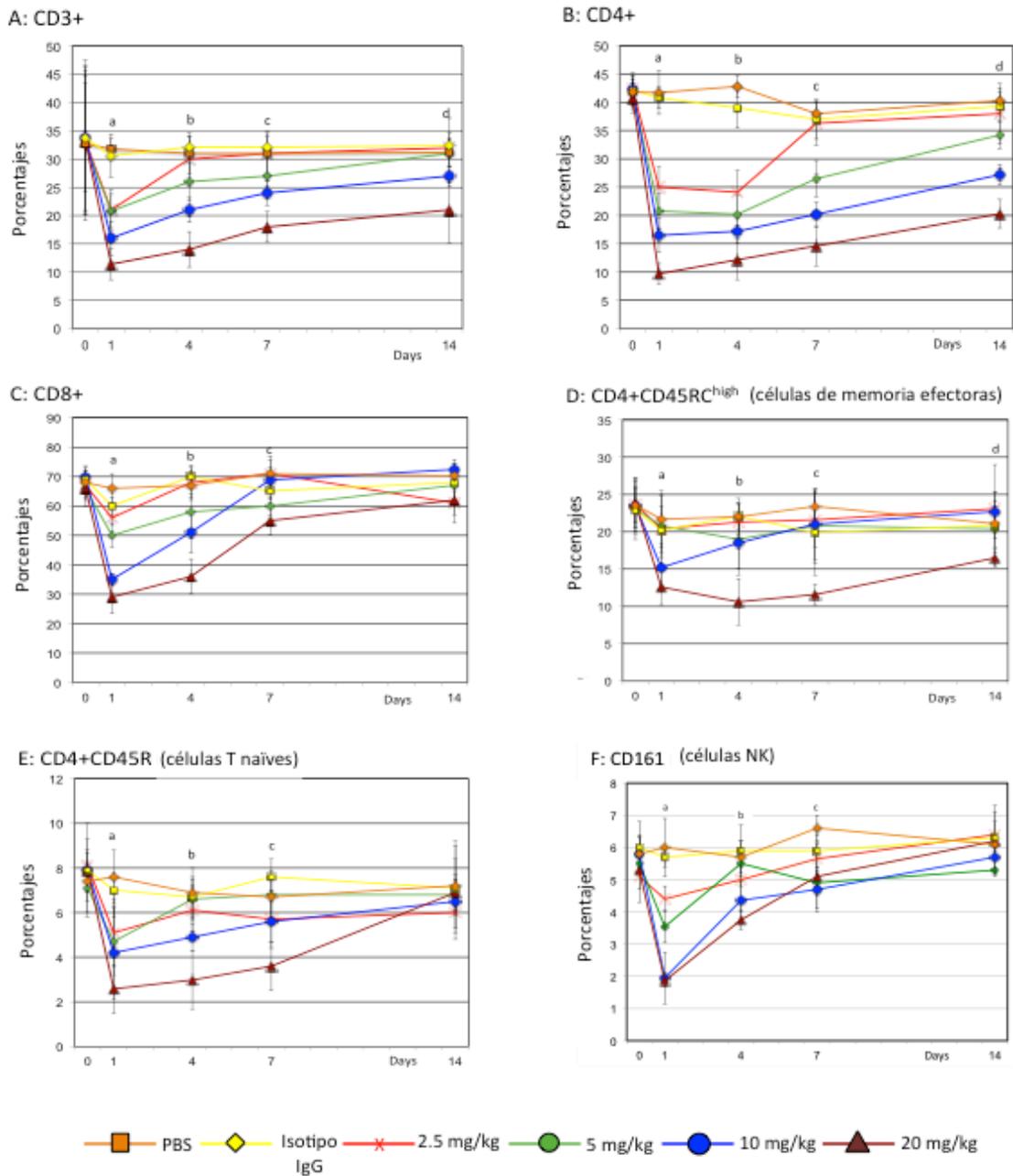


(B) Paneles de FACS representativos de un experimento en los cuales se muestran los efectos de la ATG en un solo experimento. En cada panel, el cuadrante inferior izquierdo representa a las células vivas, mientras que el cuadrante inferior derecho y el cuadrante superior derecho representan a las células con apoptosis temprana y apoptosis tardía respectivamente. En este experimento la apoptosis temprana fue de 14% (sin ATG), 31,2% (con 10 µg/ml de ATG), 62,6% (con 50 µg/ml de ATG), 23,3% (con 100 µg/ml de ATG) y 34,6% (con 250 µg/ml de ATG), respectivamente. Mientras que las cifras de apoptosis tardía fueron de 1,1% (sin ATG), 1,3% (con 10 µg/ml de ATG), 13,8% (con 50 µg/ml de ATG), 30,5% (con 100 µg/ml de ATG) y 54,5% (con 250 µg/ml de ATG), respectivamente.

### 3. Proliferación homeostática inducida a través de diferentes dosis de ATG en distintas subpoblaciones de células T.

El impacto de diferentes dosis de rATG se analizó a través de los cambios fenotípicos observados en las sub-poblaciones de linfocitos T. Como se muestra en la **figura 8 (A-F)**, el tratamiento con rATG indujo una depleción transitoria dosis-dependiente de los linfocitos T; las células T naïves se agotaron rápidamente incluso con dosis mas bajas de ATG,

mostrando una repoblación celular lenta; en tanto las células T de memoria efectoras requirieron dosis más altas rATG para depletarse y además presentaron una proliferación más rápida a nivel de la sangre periférica (excepto para las dosis muy altas de rATG 20 mg/kg). **(A)** Depleción de las células CD3+: a= Isotipo IgG vs. todas las dosis de rATG ( $p < 0,05$ ); b= Isotipo IgG vs. 5, 10, o 20 mg/kg ( $p < 0,01$ ); c= Isotipo IgG vs. 5, 10, o 20 mg/kg ( $p < 0,001$ ); y d= Isotipo IgG vs. 20 mg/kg ( $p < 0,0001$ ). **(B)** Resultados con las células CD4+: a= Isotipo IgG vs. todas las dosis de rATG ( $p < 0,001$ ); b= Isotipo IgG vs. todas las dosis de rATG ( $p < 0,001$ ); c= Isotipo IgG vs. 5, 10, y 20 mg/kg ( $p < 0,001$ ); y d= Isotipo IgG vs. 10 y 20 mg/kg ( $p < 0,001$ ). **(C)** En relación con el agotamiento de las células CD8+: a= Isotipo IgG vs. todas las dosis de rATG ( $p < 0,05$ ); b= Isotipo IgG vs. 5, 10, y 20 mg/kg ( $p < 0,01$ ); y c= Isotipo IgG vs. 10 y 20 mg/kg ( $p < 0,001$ ). **(D)** Las células CD4+CD45RC<sup>high</sup> (células T de memoria efectoras): a= Isotipo IgG vs. 10 y 20 mg/kg ( $p < 0,001$ ); b, c, y d= Isotipo IgG vs. 20 mg/kg ( $p < 0,01$ ). **(E)** Respecto a las células CD4+CD45R (células T naïves): a= Isotipo IgG vs. todas las dosis de rATG ( $p < 0,05$ ); b= Isotipo IgG vs. 5, 10, y 20 mg/kg ( $p < 0,05$ ); y c= Isotipo IgG vs. 10 y 20 mg/kg ( $p < 0,05$ ). Como se muestra en la **figura 8F**, las células NK mostraron una depleción rápida inducida por la rATG con una repoblación rápida en sangre periférica, CD161+: a= Isotipo IgG vs. todas las dosis de rATG ( $p < 0,05$ ) y b= Isotipo IgG vs. 5, 10, y 20 mg/kg ( $p < 0,05$ ). Nosotros no pudimos demostrar algún efecto del rATG sobre las células B (datos no graficados).

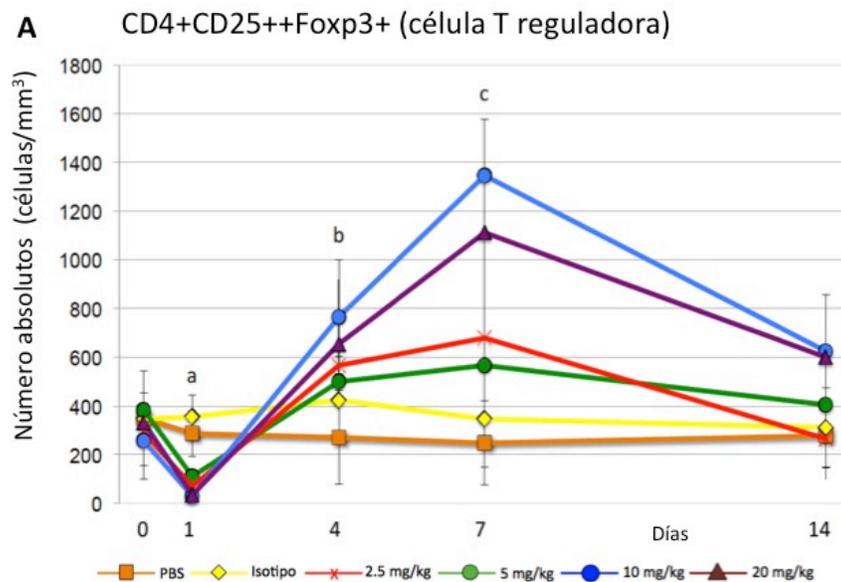


**FIGURA 8. Proliferación homeostática *in vivo* inducida por rATG.** Se muestran las gráficas de los diferentes cambios fenotípicos observados en las subpoblaciones de células T de sangre periférica con diferentes dosis únicas de rATG (cada grupo tiene nueve ratas). Isotipo IgG (diamantes amarillos); control PBS (cuadrados naranjas); 2.5 mg/kg (cruces rojas); 5 mg/kg (círculos verdes); 10 mg/kg (círculos azules); y 20 mg/kg (triángulos cafés). (A) Depleción de células CD3+. (B) Hallazgos en linfocitos CD4+. (C) Representa a los linfocitos CD8+. (D) Fenotipo correspondiente a las células T de memoria CD4+CD45RC<sup>high</sup>. (E) Se muestran las células T naïves CD4+CD45R. (F) Corresponde a las células asesinas naturales (células NK) CD161+.

#### **4. ATG induce una expansión transitoria *in vivo* de las células CD4+CD25++Foxp3+ (Tregs).**

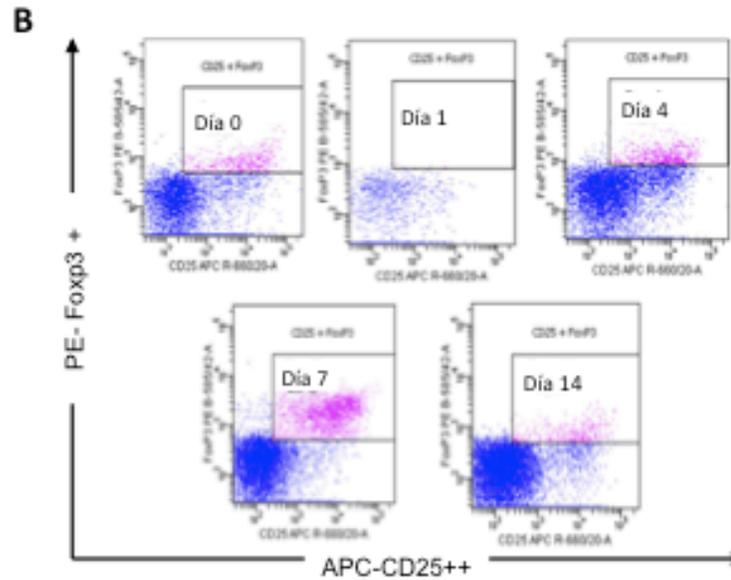
El efecto observado en la expansión de las células Treg en sangre periférica se muestra en la **figura 9 (A-D)**. **(A)** Después del tratamiento con rATG, los animales mostraron una depleción de Tregs directamente proporcional a la dosis administrada (a= Isotipo IgG vs. todas las dosis de rATG,  $p < 0,05$ ). Posteriormente, se observó una proliferación progresiva de estas células, con un punto más alto de proliferación al séptimo día de la administración de rATG (b= Isotipo IgG vs. 10 y 20 mg/kg,  $p < 0,001$ ), a partir de entonces volver a sus valores basales. **(B)** Paneles de FACS representativos que muestran el efecto de rATG en un solo experimento. Las cajas de los paneles muestran los cambios en el número de Tregs a través del tiempo, luego de la administración de una dosis intravenosa de rATG (10 mg/kg): 1,7% (día 0), 0,1% (día 1), 3,2% (día 4), 5,7% (día 7) y 1,1 % (día 14). **(C)** Se muestran los resultados de la incorporación de BrdU por parte de las células Tregs. La línea y cuadrados anaranjados representan los resultados observados en un grupo de ratas Wistar no tratadas (el control se realizó con la administración intravenosa de PBS) (n= 3). La línea y círculos de color azul, representan a las ratas tratados con una dosis intravenosas de rATG (10 mg/kg) (n= 3). Se puede observar como las Tregs de sangre periférica muestran una depleción transitoria pero con un incremento gradual y significativo de las células CD4+CD25++Foxp3+BrdU+ en los

días 7 y 14. En comparación con las ratas no tratadas, se demostró un incremento estadísticamente significativo de las células CD4+CD25++Foxp3+BrdU+ a favor de las ratas tratadas con rATG (a=  $p < 0,001$ , b=  $p < 0,001$ , y c=  $p < 0,001$ ). **(D)** Se muestran los paneles de FACS representativos de un experimento único, se puede observar como a través del tiempo, la proliferación de Tregs marcadas con BrdU mostraron los porcentajes mas altos. De izquierda a derecha y de arriba a abajo, se observan a las células marcadas con BrdU+ dentro de las células Foxp3+ con 0,2% (día 0), 0,1% (día 1), 1,8 % (día 4), 4,8% (día 7) y 2,7% (día 14), lo que ilustra una rápida expansión de Tregs inducida por rATG.

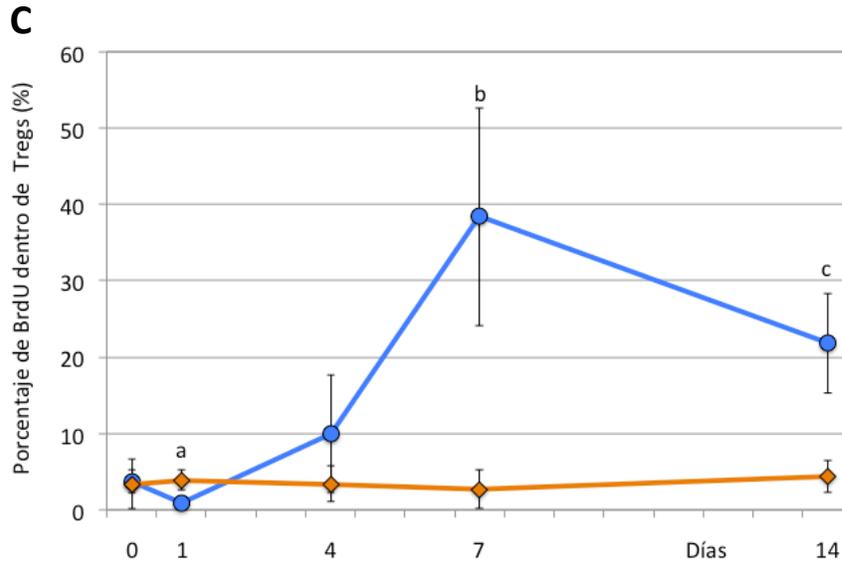


**FIGURA 9. Proliferación de CD4+CD25++Foxp3+ después de la administración de ATG anti-rata.** Cambios fenotípicos celulares observados con diferentes dosis únicas de rATG. (Cada grupo tiene nueve ratas). Isotipo IgG de conejo (diamantes amarillos) y PBS (cuadros naranjas) como controles; ATG 2.5 mg/kg (cruces rojas), 5 mg/kg (círculos verdes), 10 mg/kg

(círculos azules), and 20 mg/kg (triángulos cafés). **A)** Los animales tratados muestran una depleción inicial del número absoluto de células T reguladoras directamente proporcional a la dosis de rATG administrada.

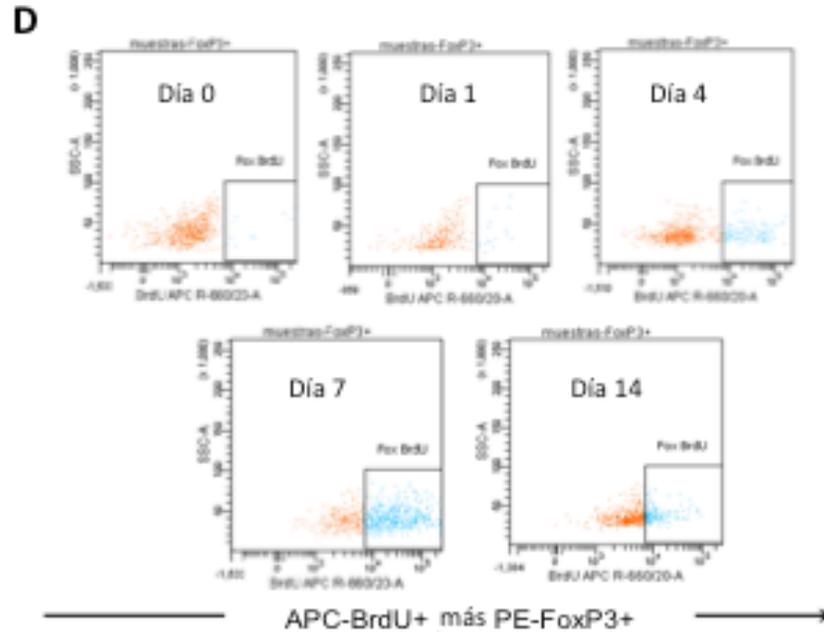


**(B)** Paneles representativos de FACS demostrando el efecto en un solo experimento de la ATG anti-rata.



**(C)** Se muestran los resultados del porcentaje de incorporación de BrdU a las células Tregs. La línea y cuadrados naranjas, representan al grupo control de

ratas Wistar no tratadas (administración intravenosa de PBS) (n=3). La línea y círculos de color azul, representa a las ratas tratadas con una dosis intravenosa de rATG (10 mg/kg) (n= 3).

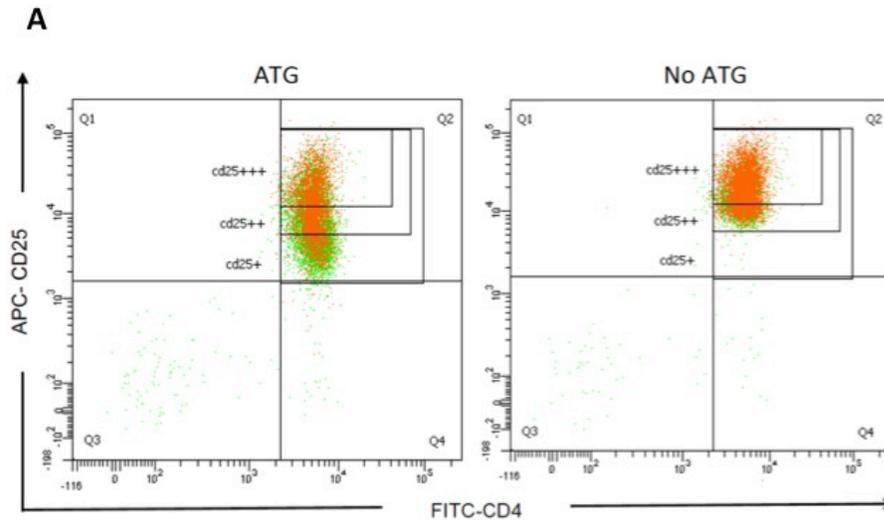


(D) Paneles de FACS representativos de un solo experimento en el que se puede observar la proliferación de Tregs marcadas con BrdU a través del tiempo. En los recuadros se puede observar de izquierda a derecha y de arriba a abajo a las células marcadas Foxp3+ mas BrdU+ con 0,2% (día 0), 0,1% (día 1), 1,8 % (día 4), 4,8% (día 7) y 2,7% (día 14), lo que ilustra la rápida expansión de las Tregs inducidas por la rATG.

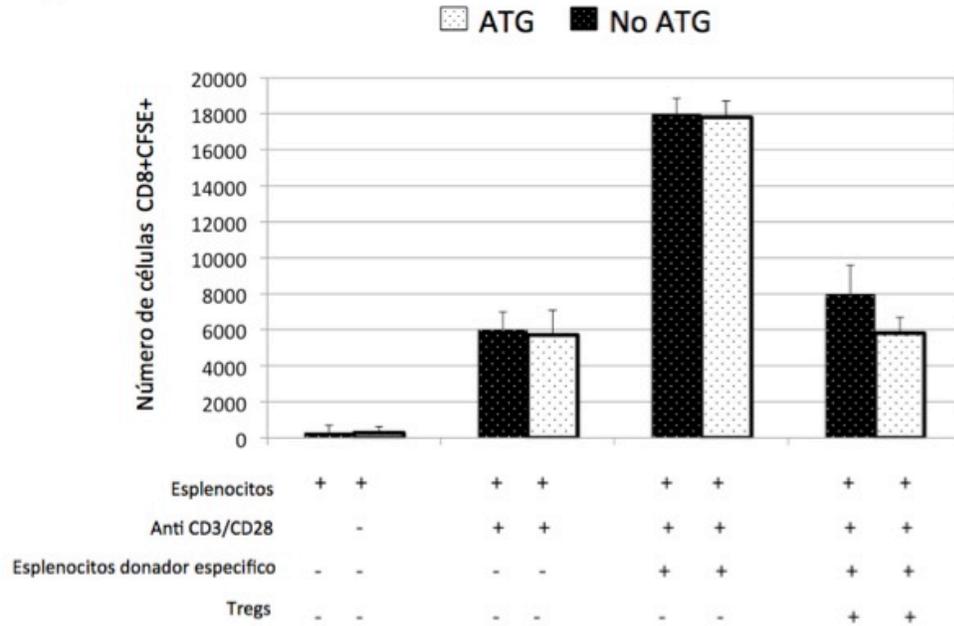
### 5. Tregs inducidas y obtenidas de la sangre periférica de ratas con trasplantes de riñón y tratadas con rATG mostraron una capacidad efectiva de supresión aloinmune y un aumento en la proporción del cociente de células Tregs/Teffectoras.

Para esta parte del análisis, se realizaron seis trasplantes renales no singénicos. Tres ratas recibieron inducción con una dosis intravenosa de

10 mg/kg de rATG y tres ratas no recibieron inducción con rATG. En la **figura 10A**, en el cuadrante superior derecho, se muestra el porcentaje de células CD3+CD4+CD25+++ obtenidas de muestras de sangre periférica de una rata tratada con rATG (panel izquierda) y de una rata no tratada con rATG (panel derecha). El recuadro superior externo mostro que las células CD4+CD25+++ presentaban hasta un 72% de expresión para Foxp3+. Por este motivo, las células localizadas en esta región, fueron las seleccionadas para llevar acabo los cultivos mixtos y con ello determinar su actividad supresora. Como se muestra en la **figura 10B**, las células T reguladoras inducidas por la rATG y obtenidas de la sangre periférica de animales trasplantados de riñón, mostraron una actividad supresora aloimmune eficaz al demostrar una adecuada capacidad para inhibir la proliferación de las células T efectoras CD8+ en los cultivos mixtos con Tregs. Aunque se observo una mayor supresión con las Tregs obtenidas de las ratas tratadas con rATG no se demostró una diferencia estadística significativa (rATG= 5,971±1,208 vs. No ATG= 8,012±1,143, p= 0,329).

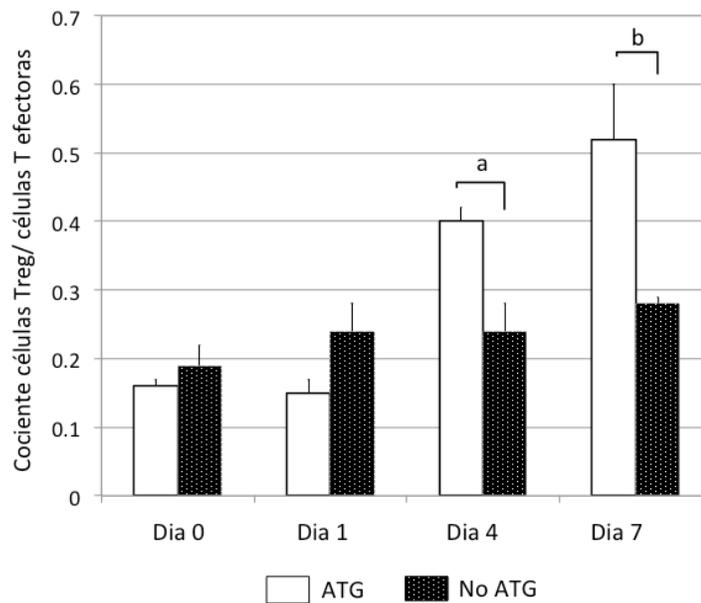


**FIGURA 10. Células T reguladoras inducidas por ATG muestran una efectiva capacidad supresora aloimmune.** Para esta parte del estudio se realizaron seis trasplantes renales no singénicos. Tres ratas recibieron una dosis intravenosa única de 10 mg/kg de rATG como terapia de inducción. Mientras que las otras tres ratas no recibieron ninguna terapia de inducción. (A) Paneles que muestran las células CD4+CD25+ obtenidas de la sangre periférica al séptimo día postrasplante. A la izquierda el panel es representativo de una rata tratada con rATG; a la derecha es un panel representativo de una rata trasplantada que no recibió terapia de inducción con rATG. En ambos paneles se marca el recuadro interior y superior con las células CD4+CD25+++ , estas células presentaban una expresión para Foxp3+ arriba del 73%. Por esta razón estas células fueron las células seleccionadas para los ensayos de supresión.

**B**

(B) Esta gráfica muestra los resultados la proliferación de células CD8+CFSE+ de los co-cultivos de esplenocitos obtenidos de las ratas trasplantadas. Las barras de la extrema izquierda se observa los cultivos de esplenocitos luego de cuatro días de incubación y sin ningún tipo de estimulación. Las barra del centro izquierda representan los cultivos estimulados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Las barras de centro a la derecha corresponden a los cultivos de esplenocitos estimulados con esplenocitos donante específicos. Al final se encuentran las barras de la extrema derecha que representan la supresión inducida por las células T reguladoras. Como se puede observar, luego de cuatro días de incubación las Tregs obtenidas de las ratas trasplantadas con o sin terapia de inducción con rATG fueron capaces de suprimir la proliferación de las células T CD8+ (a= rATG: 5971±1208 versus No ATG: 8000±1143,  $p=0.329$ ).

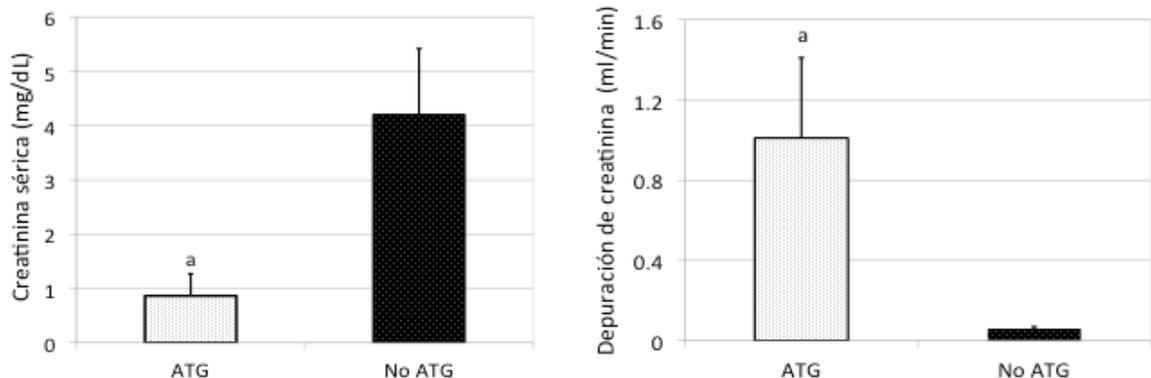
Por otro lado, un hallazgo interesante fue cuando se analizó el comportamiento fenotípico de las sub-poblaciones celulares de las ratas trasplantadas, en las que se observó que la relación entre las células Tregs y las células T de memoria efectoras presentaban un aumento significativo del cociente Treg/Tefectoras a lo largo del tiempo en el grupo de ratas tratadas con rATG (**figura 11**).



**FIGURA 11. La ATG anti rata incrementa el cociente Tregs/T efectoras.** Un análisis de la relación entre las células T reguladoras (**CD4+CD25++FoxP3+**) y las células T efectoras (**CD4+CD45RC<sup>high</sup>**) obtenidas de sangre periférica de las ratas trasplantadas con o sin terapia de inducción con rATG reveló un aumento significativo de la relación de Treg/Tefectoras a lo largo del tiempo. Este efecto fue significativamente más evidente en las ratas tratadas con rATG en comparación con las ratas que no recibieron este medicamento: a= ATG  $0,4\pm 0,03$  vs No ATG  $0,24\pm 0,05$ ,  $p < 0,01$  (Día 4); b= ATG  $0,51\pm 0,09$  vs No ATG  $0,28\pm 0,01$ ,  $p < 0,001$  (día 7).

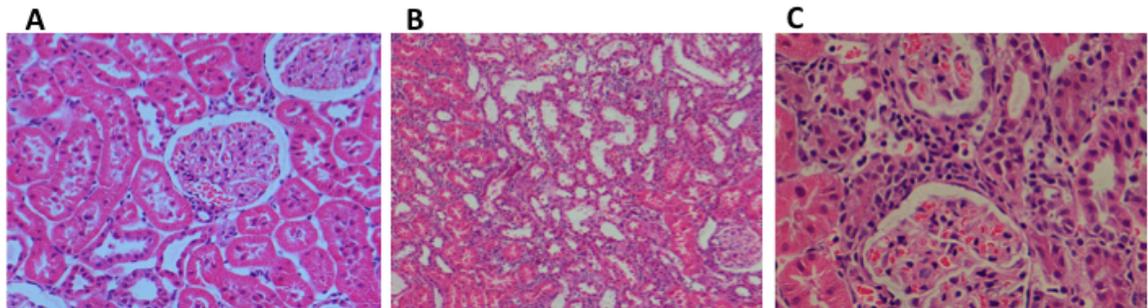
**6. Se observó una mejor función del injerto renal en las ratas trasplantadas que recibieron terapia de inducción con rATG.**

En comparación con las ratas que no recibieron terapia de inducción con rATG, la administración de 10 mg/kg de rATG, favoreció una mejor función del injerto renal cuantificada al séptimo día de seguimiento postrasplante (**figura 12**), en donde, las cifras de creatinina sérica fueron significativamente menores (a= rATG:  $0.8 \pm 0.4$  vs. No ATG  $4.2 \pm 1.2$  mg/dl,  $p < 0.01$ ); de igual forma, la cuantificación de la depuración de creatinina fue significativamente mas alta en el grupo tratado con rATG (a= rATG:  $1.01 \pm 0.4$  vs. No ATG  $0.06 \pm 0.01$  mL/24 horas,  $p < 0.01$ ). Cabe señalar que el deterioro en la función renal en las ratas que no recibieron rATG se asoció con datos histologicos de rechazo celular agudo e inflamación (**figura 13**).



**FIGURA 12.** La administración de ATG mantiene una adecuada función del injerto en ratas con trasplante renal no singénico sometidas a una dosis única de terapia de inducción de 10 mg/kg de rATG intravenoso.

La evaluación de la creatinina sérica se realizó al séptimo día de seguimiento postrasplante y mostró una diferencia estadísticamente significativa (a= ATG:  $0.8 \pm 0.4$  versus No ATG  $4.2 \pm 1.2$  mg/dl,  $p < 0.01$ ). Así mismo la depuración de creatinina también cuantificada al séptimo día de seguimiento postrasplante fue significativamente superior en las ratas tratadas con rATG (a= ATG:  $1.01 \pm 0.4$  versus  $0.06 \pm 0.01$  mL/24 horas,  $p < 0.01$ ).



**FIGURA 13. La terapia de inducción con rATG evito el desarrollo de rechazo celular agudo en ratas sometidas a un trasplante renal no singénico.** Las fotografías muestran tinciones con hematoxilina y eosina en cortes histológicos representativos: (A) cortes de un injerto renal representativo de una rata tratada con rATG sin evidencia de rechazo agudo (Ácido periyódico de Schiff X400). (B) Cortes de un injerto renal representativo de una rata no tratada con rATG en la que se observa datos histológicos de tubulitis con infiltración linfocitaria y células compatibles con rechazo celular agudo (Ácido periyódico de Schiff X200). (C) Amplificación de un corte representativo de injerto renal de una rata trasplantada con ausencia de terapia de inducción y datos de glomerulitis y tubulitis compatibles con rechazo celular agudo (Ácido periyódico de Schiff X400)

## X. DISCUSION

Nuestro estudio muestra el efecto de una rATG específica para rata Wistar en la proliferación homeostática de linfocitos T. El análisis de los estudios in vitro evidenció una adecuada capacidad para inducir apoptosis. Mientras que los resultados de la evaluación in vivo revelaron una depleción rápida de las células CD3+, CD4+, CD8+, células T reguladoras, células naïves y células NK, de forma directamente proporcional a la dosis rATG. Sin embargo este efecto no fue proporcional para las células T de memoria efectoras, las cuales, para depletarse, necesitaron dosis significativamente más altas de rATG. Un punto importante de nuestros hallazgos fue el incremento progresivo y significativo del cociente de células Tregs/Teffectoras durante la proliferación homeostática de ratas con trasplante renal alogénico. Así mismo el estudio de supresión utilizando Tregs inducidas por rATG, mostró una adecuada capacidad de inhibir la proliferación de células CD8+, en cultivos alogénicos mixtos. Estos hallazgos se tradujeron en una notable función del injerto en las ratas que recibieron terapia de inducción con rATG. Con estos resultados nosotros confirmamos el efecto inmunomodulador que tiene el rATG, más allá de la simple depleción de células T en los alotrasplantes.

El efecto de diferentes dosis de ATG en poblaciones celulares fue descrita por primera vez por *Preville y colaboradores* en monos *Cynomolgus* (17), más adelante se publicaron estos efectos sobre

células periféricas de ratones y en algunos estudios en seres humanos (18, 22, 23, 24, 112). De hecho, varios grupos han demostrado que la adición de dosis bajas de ATG son capaces de incrementar la expresión de CD4<sup>+</sup> CD25<sup>++</sup>Foxp3<sup>+</sup> conservando adecuadamente sus propiedades supresoras en cultivos alogénicos (19, 22, 113, 127). En este sentido, nuestro estudio también muestran un modelo de proliferación homeostática caracterizado por una expansión de células T reguladoras después de la administración inclusive de dosis bajas de ATG.

El efecto que las células T reguladoras tienen sobre la proliferación homeostática de linfocitos T fue evaluada por *Shen y colaboradores* quienes demostraron que las Tregs interferían en la división celular de las células T al provocar probablemente una baja afinidad de su receptor (TCR) a ligandos; además las Tregs interfirieron en la diferenciación celular de las células T naïves a células T de memoria y se demostró la participación de las Tregs para favorecer la apoptosis de las células T CD4<sup>+</sup> de memoria efectoras (6). *Winstead y colaboradores* observaron que las células T reguladoras proporcionaban un efecto modulador de la respuesta inmune ya que la ausencia de Foxp3<sup>+</sup> durante la proliferación homeostática ocasionaba la pérdida de la capacidad de respuesta antígeno-específica, mientras que la presencia de Tregs en los períodos de reconstitución inmunológica, permitieron conservar la diversidad de TCR de forma óptima con capacidad de respuesta antígeno específica (128). Estos hallazgos sugieren la participación de las Tregs en la

modulación de la re-población celular durante la proliferación homeostática, lo que permiten suponer la importancia en la práctica clínica que potencialmente tendría la administración de rATG como terapia de inducción en los trasplantes de órganos (1, 9, 13)

Como se ha comentado previamente, la evidencia experimental muestra que la proliferación homeostática, puede funcionar mediante la generación de células T de memoria aloespecífica resistentes a estrategias inductoras de tolerancia inmunológica, como una barrera a la tolerancia del trasplante de órganos sólidos (7, 8, 129).

Por lo tanto, parece que el equilibrio entre las respuestas inmunes reguladoras y efectoras podría ser crucial para determinar el estado inmunológico predominante durante la proliferación homeostática (9). Mientras que las células T de memoria son mucho más resistentes a la depleción y requieren de dosis altas de ATG, las células naïves y la Tregs proliferan en niveles significativamente más altos a las células T efectoras aun con la administración de dosis bajas de ATG (1).

En este sentido, los resultados de nuestro estudio, revelaron un aumento de la relación celular Tregs/Tefectoras durante la proliferación homeostática inducida por rATG. Estos resultados sugerirían una potencial preferencia biológica inducido por la ATG hacia una modulación reguladora de la respuesta celular mas que promover una función inmunológica efectora. Estas observaciones también podría ser de gran

relevancia clínica ya que la combinación de rATG con otros inmunosupresores, potencialmente podría favorecer un efecto tolerogénico. En esta línea, trabajos realizados previamente en nuestro servicio permitieron demostrar que la combinación de ATG con rapamicina sería de gran interés para promover una hiporespuesta donante específica aun después del trasplante renal (113, 130). *Noris y colaboradores* demostraron que el uso de dosis altas de inhibidores de la calcineurina, podría dejar potencialmente sin efecto la regulación inmune impulsada por las células T reguladoras inducida por la administración de ATG (131), señalando la importancia de modular la respuesta inmune con fármacos que permitan inducir un efecto tolerogénico como serían la administración conjunta con dosis bajas de sirolimus, mofetil micofenolato o ATG (131).

Una barrera importante para la regulación aloinmune en los seres humanos ha sido la presencia de una alta frecuencia de células T de memoria efectoras preformadas (132). Estudios han señalado, que el uso de agentes depletors de células T podrían favorecer especialmente la proliferación homeostática de las células T de memoria efectoras y con ello incrementar el riesgo de rechazo al injerto en pacientes con esquemas de inmunosupresión libres de inhibidores de calcineurina (41). Curiosamente, en nuestro estudio, hemos demostrado que además de conservar la función supresora las células T reguladoras, la administración del ATG favoreció una mayor proporción de la relación

Tregs/Teffectoras. Estos datos sugieren que no sólo la preservación de la actividad supresora de Tregs, sino también el aumento de la relación de Tregs respecto a las células T efectoras podrían añadir a la ATG un valor biológico que facilite la hiporeactividad anti-donador (113, 130, 133).

Nosotros creemos que nuestros hallazgos podrían ser equivalentes a los que se podrían obtener utilizando otras preparaciones de ATG en humanos, específicamente con Timoglobulina. La generación de nuestro ATG fue realizado mediante la inmunización de conejos con timocitos de ratas Wistar, mientras que la generación de otras presentaciones de ATG como ATG-Fresenius se obtiene mediante la inmunización con células Jurkat (11, 12). *Popow y colaboradores*, recientemente han discutido como los efectos inmunomoduladores e inmunosupresores de las distintas presentaciones de ATG es mediado por la interacción de múltiples anticuerpos dirigidos contra una amplia variedad de potenciales antígenos celulares (134). *Popow* realizó un análisis experimental minucioso y utilizando clonaciones de expresiones retrovirales, estudiaron la diversidad de la expresión de anticuerpos de Timoglobulina versus ATG-Fresenius, encontrando importantes diferencias en la expresión de anticuerpos contra distintos antígenos lo que traduciría en potenciales variaciones clínicas al momento de su administración (134, 135). En esta línea, *Cicora y colaboradores* publicaron un estudio clínico retrospectivo en que la comparación entre las dos presentaciones comerciales de ATG no mostro diferencias clínicas significativas luego de

tres meses de seguimiento (136). De forma similar *Schnetzler* no encontró diferencias al estudiar el impacto de dos presentaciones en pacientes receptores de corazón (137). Sin embargo, *Terasako* y *colaboradores* observó un mayor efecto inmunosupresor con Timoglobulina en receptores de trasplante de medula ósea respecto a la presentación de ATG-Fresenius, lo que favoreció una mayor incidencia de infecciones asociadas a CMV (138). Tomando en cuenta estos hallazgos y considerando las variaciones de anticuerpos entre las distintas presentaciones comerciales de ATG podría ser interesante evaluar mediante un ensayo clínico controlado el papel de estas dos presentaciones comerciales de ATG en pacientes receptores de trasplante renal.

Una importante traducción biológica de nuestros experimentos, ocurrió al analizar la función del injerto de las ratas sometidas a trasplante renal que recibieron terapia de inducción con rATG; estas ratas presentaron menores cifras de creatinina y mejores niveles en la depuración de creatinina fenómeno que fue asociado con la ausencia de rechazo celular agudo en el injerto.

En conclusión, nuestro estudio proporciona evidencias interesantes de un efecto modular de una ATG específica para rata Wistar en la proliferación homeostática de células T. Se demostró un incremento en las células T reguladoras, con una capacidad supresora alógeno conservada, destacando también, el cambio en la relación

Tregs/Tefectoras lo que brindaría a este rATG potenciales propiedades inmunomoduladoras mas allá de la depleción celular característica. Creemos que nuestros datos podrían ser de relevancia clínica ya que la combinación de diversas fármacos inmunosupresores utilizados con el ATG, serían cruciales para promover el efecto tolerogénico en receptores de trasplante de órganos.

## **XI. BIBLIOGRAFIA**

- 1) Tchao NK, Turka LA. Lymphodepletion and Homeostatic Proliferation: Implications for Transplantation. *Am J Transplant* 2012; 12: 1079-1090.
- 2) Freitas AA, Rocha BB. Lymphocyte lifespans: homeostasis, selection and competition. *Immunol Today*. 1993 Jan;14(1):25-9.
- 3) Tanchot C, Rosado MM, Agenes F, Freitas AA, Rocha B. Lymphocyte homeostasis. *Semin Immunol* 1997; 9: 331–337.
- 4) Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science*. 1998 Apr 10;280(5361):243-8.
- 5) Mazzucchelli R, Durum SK. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev Immunol*. 2007 Feb;7(2):144-54.
- 6) Shen S, Ding Y, Tadokoro CE, Olivares-Villagómez D, Camps-Ramírez M, Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Control of homeostatic proliferation by regulatory T cells. *J Clin Invest*. 2005 Dec;115(12):3517-26.
- 7) Moxham VF, Karegli J, Phillips RE, Brown KL, Tapmeier TT, Hangartner R, Sacks SH, Wong W. Homeostatic proliferation of lymphocytes results in augmented memory-like function and accelerated allograft rejection. *J Immunol*. 2008 Mar 15;180(6):3910
- 8) Wu Z, Bensinger SJ, Zhang J, Chen C, Yuan X, Huang X, Markmann JF, Kassaee A, Rosengard BR, Hancock WW, Sayegh MH, Turka LA. Homeostatic proliferation is a barrier to transplantation tolerance. *Nat Med*. 2004 Jan;10(1):87-92
- 9) Haldinger KL, Brennan DC, Klein CL. Selection of induction therapy in kidney transplantation. *Transpl Int* 2013; 26: 662–672
- 10)Thiyagarajan UM, Ponnuswamy A, Bagul A. Thymoglobulin and its use in renal transplantation: a review. *Am J Nephrol*. 2013;37(6):586-601.
- 11)Gaber AO, Monaco AP, Russell JA, Lebranchu Y, Mohty M. Rabbit

- antithymocyte globulin (thymoglobulin): 25 years and new frontiers in solid organ transplantation and haematology. *Drugs*. 2010 Apr 16;70(6):691-732.
- 12) Deeks ED, Keating GM. Rabbit antithymocyte globulin (thymoglobulin): a review of its use in the prevention and treatment of acute renal allograft rejection. *Drugs*. 2009 Jul 30;69(11):1483-512.
  - 13) Cruzado JM, Bestard O, Grinyó JM. New immunosuppressive protocols with the advent of novel biological drugs. *Transplantation*. 2009;15;(3):S20-3.
  - 14) Bacigalupo A, Lamparelli T, Bruzzi P, et al. Antithymocyte globulin for graft-versus-host disease prophylaxis in transplants from unrelated donors: randomized studies from Gruppo Italiano Trapianti Midollo Osseo (GITMO). *Blood* 2001; 98: 2942.
  - 15) Mueller TF: Mechanisms of action of thymoglobulin. *Transplantation* 2007;84:5–10.
  - 16) Mohty M. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. *Leukemia* 2007; 21, 1387-1394.
  - 17) Prévaille X, Flacher M, LeMauff B, Beauchard S, Davelu P, Tiollier J, Revillard JP. Mechanisms involved in antithymocyte globulin immunosuppressive activity in a nonhuman primate model. *Transplantation*. 2001 Feb 15;71(3):460-8.
  - 18) Ruzek MC, Neff KS, Luong M, Smith KA, Culm-Merdek K, Richards SM, Williams JM, Perricone M, Garman RD. In vivo characterization of rabbit anti-mouse thymocyte globulin: a surrogate for rabbit anti-human thymocyte globulin. *Transplantation*. 2009 Jul 27;88(2):170-9.
  - 19) Lopez M, Clarkson MR, Albin M, Sayegh MH, Najafian N. A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(10):2844-2853.
  - 20) Feng X, Kajigaya S, Solomou EE, Keyvanfar K, Xu X, Raghavachari

- N, Munson PJ, Herndon TM, Chen J, Young NS. Rabbit ATG but not horse ATG promotes expansion of functional CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in vitro. *Blood*. 2008;111(7):3675-83.
- 21) Broady R, Yu J, Levings MK. ATG-induced expression of FOXP3 in human CD4(+) T cells in vitro is associated with T-cell activation and not the induction of FOXP3(+) T regulatory cells. *Blood*. 2009 Dec 3;114(24):5003-6.
- 22) Gurkan S, Luan Y, Dhillon N, Allam SR, Montague T, Bromberg JS, Ames S, Lerner S, Ebcioğlu Z, Nair V, Dinavahi R, Sehgal V, Heeger P, Schroppel B, Murphy B. Immune reconstitution following rabbit antithymocyte globulin. *Am J Transplant*. 2010 Sep;10(9):2132-41
- 23) Sewgobind VD, Kho MM, van der Laan LJ, Hendriks TK, van Dam T, Tilanus HW, IJzermans JN, Weimar W, Baan CC. The effect of rabbit anti-thymocyte globulin induction therapy on regulatory T cells in kidney transplant patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 May;24(5):1635-44.
- 24) Sewgobind VD, van der Laan LJ, Kho MM, Kraaijeveld R, Korevaar SS, van Dam T, IJzermans JN, Weimar W, Baan CC. Characterization of rabbit antithymocyte globulins-induced CD25<sup>+</sup> regulatory T cells from cells of patients with end-stage renal disease. *Transplantation*. 2010 Mar 27;89(6):655-66.
- 25) Goldrath AW, Bevan MJ. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 1999; 402: 255-262.
- 26) Wherry EJ, Ahmed R. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J Virol* 2004; 78: 5535-5545.
- 27) Freitas AA, Rocha B. Population biology of lymphocytes: The flight for survival. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 83–111.
- 28) Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, Lefrançois L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 2000; 1: 426–432.

- 29)Fry TJ, Mackall CL. The many faces of IL-7: From lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. *J Immunol* 2005; 174: 6571– 6576.
- 30)Takada K, Jameson SC. Naive T cell homeostasis: From awareness of space to a sense of place. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 823–832.
- 31)Min B, Foucras G, Meier-Schellersheim M, Paul WE. Spontaneous proliferation, a response of naive CD4 T cells determined by the diversity of the memory cell repertoire. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:3874–3879.
- 32)Martin B, Bourgeois C, Dautigny N, Lucas B. On the role of MHC class II molecules in the survival and lymphopenia-induced proliferation of peripheral CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 6021–6026.
- 33)Gudmundsdottir H, Turka LA. A closer look at homeostatic proliferation of CD4+ T cells: Costimulatory requirements and role in memory formation. *J Immunol* 2001; 167: 3699–3707.
- 34)Surh CD, Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* 2008; 29: 848–862.
- 35)Min B, Yamane H, Hu-Li J, Paul WE. Spontaneous and homeostatic proliferations of CD4 T cells are regulated by different mechanisms. *J Immunol* 2005; 174: 6039–6044.
- 36)Neujahr DC, Chen C, Huang X, et al. Accelerated memory cell homeostasis during T cell depletion and approaches to overcome it. *J Immunol* 2006; 176: 4632–4639.
- 37)Goldrath AW, Bogatzki LY, Bevan MJ. Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *J Exp Med* 2000; 192: 557–564.
- 38)Sener A, Tang AL, Faber DL. Memory T-cell predominance following T-cell depletion therapy derives from homeostatic expansion of naives T cells. *Am J Transplant* 2009; 9:2615-2623.
- 39)Cho BK, Rao VP, Ge Q, Eisen HN, Chen J. Homeostasis stimulated proliferation drives naive T cells to differentiate directly into memory

- T cells. *J Exp Med* 2000; 192: 549–556.
- 40) Min B, McHugh R, Sempowski GD, Mackall C, Foucras G, Paul WE. Neonates support lymphopenia-induced proliferation. *Immunity* 2003; 18:131–140.
- 41) Pearl JP, Parris J, Hale DA, Hoffmann SC, Bernstein WB, McCoy KL, Swanson SJ, Mannon RB, Roederer M, Kirk AD. Immunocompetent T-cells with a memory-like phenotype are the dominant cell type following antibody-mediated T-cell depletion. *Am J Transplant*. 2005 Mar;5(3): 465-74.
- 42) Ge Q, Hu H, Eisen HN, Chen J. Different contributions of thymopoiesis and homeostasis driven proliferation to the reconstitution of naive and memory T cell compartments. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 2989–2994
- 43) Tanchot C, Le Campion A, Martin B, Leament S, Dautigny N, Lucas B. Conversion of naive T cells to a memory-like phenotype in lymphopenic hosts is not related to a homeostatic mechanism that fills the peripheral naive T cell pool. *J Immunol* 2002; 168:5042–5046.
- 44) Metchnikoff E. Etudes sur la resorption des cellules. *Ann Inst Pasteur* 1899;13:737–69.
- 45) Chew WB, Lawrence JS. Antilymphocyte Serum. *J Immunol* 1937;33:271–8.
- 46) Cruikshank AH. Anti-lymphocyte serum. *Br J Exp Pathol* 1941;22:126–36.
- 47) Inderbitzen T. The relationship of lymphocytes, delayed cutaneous allergic reactions and histamine. *Int Arch Allergy* 1956;8:150–9.
- 48) Waksman BH, Arbuoys S, Arnason BG. The use of specific 'lymphocyte' antisera to inhibit hypersensitive reactions of the 'delayed' type. *J Exp Med* 1961;114:997–1022.
- 49) Woodruff MFA, Anderson NA. The effect of lymphocyte depletion by thoracic duct fistula and the administration of antilymphocytic serum

- on the survival of skin homografts in rats. *Nature* 1963; 200:702–704.
- 50) Nagaya H, Sieker HO. Allograft survival: effect of antisera to the thymus glands and lymphocytes. *Science* 1965;150:1181–2.
- 51) Levey RH, Medawar PB. Nature and mode of action of antilymphocytic serum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1966;56:1130–7.
- 52) Anderson NF, James K, Woodruff MFA. Effect of antilymphocytic antibody and antibody fragments on skin-homograft survival and the blood lymphocyte count in rats. *Lancet* 1967;1:1126–8.
- 53) James K, Medawar PB. Characterization of antilymphocytic antibody. *Nature* 1967;5:1052–3.
- 54) Mitchell RM, Sheil AGR, Slafsky SF, Murray JE. The effect of heterologous immune serum on canine renal homografts. *Transplantation* 1966;4:323–9.
- 55) Monaco AP, Abbott WM, Otherson HB, Simmons RL, Wood ML, Flax MH, et al. Antiserum to lymphocytes: prolonged survival of canine renal allografts. *Science* 1966;153:1264–7.
- 56) Lawson RK, Ellis LR, Kircheim D, Hodges CV. The prolongation of canine renal homograft function using antilymphocyte serum as an immunosuppressive agent. *Transplantation* 1967;5:169–83.
- 57) Weil R, Simmons RL. Combined immunosuppression for canine renal allograft prolongation: antilymphocyte serum plus prednisolone or azathioprine. *Ann Surg* 1968;167:919–22.
- 58) Monaco AP, Wood ML, Russell PS. Some effects of purified heterologous antihuman lymphocyte serum in man. *Transplantation* 1967;5:1106–14.
- 59) Iwasaki Y, Porter KA, Amend JR, Marchioro TL, Zuhlke V, Starzl TE. The preparation and testing of horse antidog and antihuman antilymphoid plasma or serum and protein fractions. *Surg Gynecol Obstet* 1967;124: 1–24.
- 60) Starzl TE, Marchioro TL, Porter KA, Iwasaki Y, Cerilli GJ. The use of

- heterologous antilymphoid agents in canine renal and liver homotransplantation and in human homotransplantation. *Surg Gynecol Obstet* 1967; 124:301–8.
- 61) Davis RC, Bjorkmann PJ. Effects of rabbit ALG on cadaver kidney transplant survival. *Ann Surg* 1972; 176: 521–8.
- 62) Taylor HE, Ackman CFD, Horowitz I. Canadian clinical trial of antilymphocyte globulin in human cadaver renal transplantation. *Can Med Assoc J* 1976;115:1205–8.
- 63) Kountz SL, Butt KHM, Rao TKS, Zielinski CM, Rafi M, Schultz JR. Antithymocyte globulin (ATG) dosage and graft survival in renal transplantation. *Transpl Proc* 1977;9:1023–5.
- 64) Launois B, Campion J-P, Fauchet R, Kerbaol M, Cartier F. Prospective randomised clinical trial in patients with cadaver kidney transplants. *Transplant Proc* 1977;9:1027–30.
- 65) Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004; 351: 2715.
- 66) Novick AC, Ho-Hsieh H, Steinmuller D, Strem SB, Cunningham RJ, Steinmuller D, et al. Detrimental effect of cyclosporin on initial function of cadaver renal allografts following extended preservation. *Transplantation* 1986;42:154–8.
- 67) Russe HP, Crowle AJ. A comparison of thymetomized and antithymocyte serum-treated mice in their development of hypersensitivity to protein antigens. *J Immunol* 1965; 94: 74-83
- 68) Schneider U, Schwenk H, Bornkamm G. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 1977;(5): pp. 621–6.
- 69) LaCorcia G, Swistak M, Lawendowski C, et al. Polyclonal rabbit antithymocyte globulin exhibits consistent immunosuppressive capabilities beyond cell depletion. *Transplantation*. 2009;87(7):966-974.

- 70)Shenton BK, Manas D, Dark JH, Talbot D, Clark KR, Bell A Immune monitoring of anti-thymocyte globulin (ATG) treatment in transplant patients. *Clinical and Applied Immunology* 2001;1:347–371.
- 71)Büchler M, Longuet H, Lemoine R, Herr F, Gatault P, Thibault G, Ternant D, Foulon C, Pilorge B, Lemay D, Sung C, Halimi JM, Baron C, Lebranchu Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of two different rabbit antithymocyte globulin dosing regimens: results of a randomized trial. *Transpl Immunol.* 2013 Mar;28(2-3):120-6
- 72)Michallet MC, Preville X, Flacher M, Fournel S, Genestier L, Revillard JP. Functional antibodies to leukocyte adhesion molecules in antithymocyte globulins. *Transplantation* 2003; 75: 657.
- 73)Wood ML, Monaco AP. Induction of cytotoxic (sensitization) and enhancing (prolonged survival) responses by injection of lymphoid cells in ALS-treated mice. *Transplant Proc.* 1979 Jun;11(2):1456-7.
- 74)Gościcka T, Rudnicka W, Tarabasz L.The estimation of lymphotoxic activity of ALS by spectrophotometric method. *J Immunol Methods.* 1977;15(1):9-15.
- 75)Genestier L, Fournel S, Flacher M, Assossou O, Revillard JP, Bonnefoy-Berard N: Induction of Fas (Apo-1, CD95)-mediated apoptosis of activate lymphocytes by polyclonal antithymocyte globulins. *Blood* 1998;91:2360–2368.
- 76)Lydyard PM, Ivanyi J. The role of opsonization in antithymocyte globulin-induced suppression of graft-versus-host reaction in chick embryos. *Transplantation.* 1974 Apr;17(4):400-4.
- 77)Von Andrian UH, Mackay CR. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 2000; 343:1020-1034.
- 78)Buysmann S, Bemelman FJ, Schellekens PT, van Kooyk Y, Figdor CG, Berge IJ. Activation and increased expression of adhesion molecules on peripheral blood lymphocytes is a mechanism for the immediate lymphocytopenia after administration of OKT3. *Blood* 1996; 87: 404–411.

- 79) Fuggle SV, Koo DD. Cell adhesion molecules in clinical renal transplantation. *Transplantation* 1998; 65: 763–769.
- 80) Beiras-Fernandez A, Chappell D, Hammer C, Beiras A, Reichart B, Thein E. Impact of polyclonal anti-thymocyte globulins on the expression of adhesion and inflammation molecules after ischemia-reperfusion injury. *Transpl Immunol*. 2009 Mar;20(4):224-8.
- 81) Mehrabi A1, Mood ZhA, Sadeghi M, Schmied BM, Müller SA, Welsch T, Kuttymuratov G, Wente MN, Weitz J, Zeier M, Morath Ch, Riediger C, Schemmer P, Encke J, Büchler MW, Schmidt J. Thymoglobulin and ischemia reperfusion injury in kidney and liver transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Sep;22 Suppl 8:viii54-viii60.
- 82) Burne-Taney MJ, Rabb H. The role of adhesion molecules and T cells in ischemic renal injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; 12: 85–90.
- 83) Clatworthy MR: Targeting B cells and antibody in transplantation. *Am J Transplant* 2011;11:1359–1367.
- 84) Zand MS, Vo T, Huggins J, Felgar R, Liesveld J, Pellegrin T, Bozorgzadeh A, Sanz I, Briggs BJ: Polyclonal rabbit antithymocyte globulin triggers B-cell and plasma cell apoptosis by multiple pathways. *Transplantation* 2005;79: 1507–1515.
- 85) Fang L, Fehse B, Engel M, Zander A, Kroger N. Antithymocyte globulin induces ex vivo and in vivo depletion of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Transplantation* 2005; 79: 369–371.
- 86) Penack O1, Fischer L, Gentilini C, Nogai A, Muessig A, Rieger K, Ganepola S, Thiel E, Uharek L. The type of ATG matters: natural killer cells are influenced differentially by Thymoglobulin, Lymphoglobulin and ATG-Fresenius. *Transpl Immunol*. 2007 Nov;18(2):85-7.
- 87) Lan F, Zeng D, Higuchi M, Higgins JP, Strober S. Host conditioning with total lymphoid irradiation and antithymocyte globulin prevents

- graft-versus-host disease: the role of CD1-reactive natural killer T cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; 9:355-363.
- 88) Zeng D, Lewis D, Dejbakhsh S, Lan F, Garcia-Ojeda M, Sibley R. Bone marrow NK1.1(-) and NK1.1(+) T cells reciprocally regulate acute graft versus host disease. *J Exp Med* 1999; 189:1073-1081.
- 89) Monti P, Allavena P, Di Carlo V, Piemonti L. Effects of anti-lymphocytes and anti-thymocyte globulin on human dendritic cells. *Int Immunopharmacol* 2003; 3: 189-196.
- 90) Gillet-Hladky S, de Carvalho CM, Bernaud J, Bendahou C, Bloy C, Rigal D. Rabbit antithymocyte globulin inhibits monocyte-derived dendritic cells maturation in vitro and polarizes monocyte-derived dendritic cells towards tolerogenic dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Transplantation* 2006; 82: 965-974.
- 91) Munn DH, Shurma MD, Lee JR, Jharer KG, Johnson TS, Keskin DB, Marshall B, Chandler P, Antonia SJ, Burgess R, Slingluff CL Jr, Mellar AL. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* 2002; 297 (5588): 1867-70
- 92) Hale DA. Biological effects of induction immunosuppression. *Curr Opin Immunol* 2004; 16: 565.
- 93) Bonefoy-Berard N, Vincent C, Revillard JP. Antibodies against functional leukocyte surface molecules in polyclonal antilymphocyte and antithymocyte globulins. *Transplantation* 1991; 51: 669.
- 94) Rebellato LM, Gross U, Verbanac KM, Thomas JM. A comprehensive definition of the major antibody specificities in polyclonal rabbit antithymocyte globulin. *Transplantation* 1994; 57: 685.
- 95) Halloran P, Ludwig D, Aprile and the Canadian Multicentre Transplant Study Group: Comparison of antilymphocyte globulin-immuran, cyclosporine and antilymphocyte globulin-cyclosporine therapy for cadaver renal Transplantation. *Transplant Proc* 1985;

17:1201-1203

- 96) Hardy MA, Nowngrod R, Elberg A, Apple G: Use of ATG in steroid-resistant rejection. *Transplantation* 1980;29:162–164.
- 97) Kreis H, Mansouri R, Descamps JM, Dandavino R, N'Guyen AT, Bach JF, Crosnier J: Antithymocyte globulin in cadaver kidney transplantation: a randomized trial based on T-cell monitoring. *Kidney Int* 1981;19:438–444.
- 98) Weimer R, Ettrich M, Renner F, Dietrich H, Süsal C, Deisz S, Padberg W, Opelz G. ATG induction in renal transplant recipients: Long-term hazard of severe infection is associated with long-term functional T cell impairment but not the ATG-induced CD4 cell decline. *Hum Immunol.* 2014 Feb 12. pii: S0198-8859(14)00085-8. doi: 10.1016/j.humimm.2014.02.015. [Epub ahead of print].
- 99) Opelz G DB: Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. *Am J Transplant* 2004;4:222–230.
- 100) Grinyo JM, Alsina J, Sabater R, Castela AM, Gil-Vernet S, Andres E, Sabate I, Mestre M, Seron D, Diaz C. Antilymphoblast globulin, cyclosporine, and steroids in cadaveric renal transplantation. *Transplantation.* 1990 Jun;49(6):1114-7.
- 101) Brennan DC, Flavin K, Lowell JA, Howard TK, Shenoy S, Burgess S, Dolan S, Kano JM, Mahon M, Schnitzler MA, Woodward R, Irish W, Singer GG: A randomized, double-blind- ed comparison of thymoglobulin versus At- gam for induction immunosuppressive therapy in adult renal transplant recipients. *Transplantation* 1999;67:1011–1018.
- 102) Brennan DC, Daller JA, Lake KD, Cibrik D, Del Castillo D: Rabbit antithymocyte globulin versus basiliximab in renal transplantation. *N Engl J Med* 2006;355:1967–1977.
- 103) Martin ST, Roberts KL, Malek SK, Tullius SG, Vadivel N, De Serres S, Grafals M, Elsanjak A, Filkins BA, Chandraker A, Gabardi

- S: Induction treatment with rabbit antithymocyte globulin versus basiliximab in renal transplant recipients with planned early steroid withdrawal. *Pharmacotherapy* 2011;31:566– 573.
- 104) Gaber AO, Matas AJ, Henry ML, Brennan DC, Stevens RB, Kapur S, Ilsley JN, Kistler KD, Cosimi AB: Thymoglobulin antibody immunosuppression in living donor recipients investigators. antithymocyte globulin induction in living donor renal transplant recipients: final report of the Tailor Registry. *Transplantation* 2012;94:331–337.
- 105) Patel SJ, Duhart BT Jr, Krauss AG, Moore LW, Egidi MF, Amiri HS, Gaber LW, Gaber AO: Risk factors and consequences of delayed graft function in deceased donor renal transplant patients receiving antithymocyte globulin induction. *Transplantation* 2008;86:313–320.
- 106) Noël C, Abramowicz D, Durand D, Mourad G, Lang P, Kessler M, Charpentier B, Touchard G, Berthoux F, Merville P, Ouali N, Squifflet JP, Bayle F, Wissing KM, Hazzan M: Daclizumab versus antithymocyte globulin in high-immunological-risk renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2009;20: 1365–1392.
- 107) Kamel MH, Mohan P, Little DM, Awan A, Hickey DP: Rabbit antithymocyte globulin as induction immunotherapy for pediatric deceased donor kidney transplantation. *J Urol* 2005;174:703–707.
- 108) Clesca P, Dirlando M, Park SI, García R, Ferraz E, Pinheiro-Machado PG, Kushnaroff L, Tedesco-Silva H Jr, Medina-Pestana JO: Thymoglobulin and rate of infectious complications after transplantation. *Transplant Proc* 2007;39:463–464.
- 109) Laftavi MR, Patel S, Soliman MR, Alnimri M, Kohli R, Said M, Pankewycz O: Low-dose thymoglobulin use in elderly renal transplant recipients is safe and effective induction therapy. *Transplant Proc* 2011;43:466– 468.
- 110) Agha IA, Rueda J, Alvarez A, Singer GG, Miller BW, Flavin K,

- Lowell JA, Shenoy S, Howard TK, Ramachandran V, Irish W, Schnitzle MA, Brennan DC: Short course induction immunosuppression with thymoglobulin for renal transplant recipients. *Transplantation* 2002;73:473–475.
- 111) Krystufkova E, Sekerkova A, Striz I, Brabcova I, Girmanova E, Viklicky O. Regulatory T cells in kidney transplant recipients: the effect of induction immunosuppression therapy. *Nephrol Dial Transplant*. 2012 Jun;27(6):2576-82.
- 112) Laftavi M, Alnimri M, Weber-Shrikatnt E, Kohli M. et al. Low dose Rabbit Antithymocyte Globulin Versus Basiliximab Induction Therapy in Low-Risk Renal Transplant Recipients: 8- Year Follow-Up. *Transplantation Proceedings*, 2011; (43): 1502-1054.
- 113) Bestard O, Cruzado JM, Mestre M, Caldés A, Bas J, Carrera M, Torras J, Rama I, Moreso F, Serón D, Grinyó JM. Achieving donor-specific hyporesponsiveness is associated with FOXP3+ regulatory T cell recruitment in human renal allograft infiltrates. *J Immunol*. 2007 Oct 1;179(7):4901-9.
- 114) Puklavec MJ, Barclay AN. Monoclonal antibodies to rat leukocyte surface antigens, MHC antigens, and immunoglobulins. *Curr Protoc Immunol*. 2001 May;Appendix 4:Appendix 4C.
- 115) Prévile X, Nicolas L, Flacher M, Revillard J. A quantitative flow cytometry assay for the preclinical testing and pharmacological monitoring of rabbit antilymphocyte globulins (rATG). *J Immunol Methods*. 2000 Nov 1; 245(1-464 2): 45-54.
- 116) Subra JF, Cautain B, Xystrakis E, Mas M, Lagrange D, van der Heijden H, van de Gaar MJ, Druet P, Fournié GJ, Saoudi A, Damoiseaux J. The balance between CD45RChigh and CD45RClow CD4 T cells in rats is intrinsic to bone marrow-derived cells and is genetically controlled. *J Immunol*. 2001 Mar 1;166(5): 2944-52.
- 117) Hargreaves M, Bell EB. Identical expression of CD45R isoforms by CD45RC+ 'revertant' memory and CD45RC+ naive CD4 T-cells.

- Immunology. 1997 Jul; 91(3): 323-30.
- 118) Collison LW, Vignali DA. In vitro Tregs suppression assays. *Methods Mol Biol.* 2011; 707:21-37.
- 119) Maghni K, Nicolescu OM, Martin JG. Suitability of cell metabolic colorimetric assays for assessment of CD4+ T cell proliferation: comparison to 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) ELISA. *J Immunol Methods.* 1999 Mar 4; 223(2): 185-481 94.
- 120) Committee on rat nomenclature, Institute of laboratory animal resources comisión on life science, National Research Council. *Definition, Nomenclature, and Conservation of Rat Strains.* ILAR News 34 (4): S3-S26, 1992
- 121) Hartl, D. L. Genetic management of Gold Standard outbred laboratory populations. Charles River Laboratories, Wilmington, MA, technical documents. 2001
- 122) Festing MF. *Inbred strains in biomedical research.* Macmillan Press, London: Oxford University Press, New York, 1979.
- 123) Hedrich H. *Genetic monitoring of inbred strains of rats.* Stuttgart, New York. Gustav Fischer Verlag, 1990.
- 124) Jennings VM, Dillehay DL. Immunology in Suckow MA, Weisbroth SH and Franklin CL. *The Laboratory Rat (Second Edition),* 2006, Pages 847-864. A volume in American College of Laboratory Animal Medicine
- 125) Herrero-Fresneda I, Torras J, Cruzado JM, Condom E, Vidal A, Riera M, Lloberas N, Alsina J, Grinyo JM. Do alloreactivity and prolonged cold ischemia cause different elementary lesions in chronic allograft nephropathy?. *Am J Pathol.* 2003 Jan; 162(1): 127-37.
- 126) Venken K, Thewissen M, Hellings N, Somers V, Hensen K, Rummens JL, Stinissen P. A CFSE based assay for measuring CD4+CD25+ regulatory T cell mediated suppression of auto-antigen specific and polyclonal T cell responses. *J Immunol Methods.* 2007

Apr 30;322(1-2): 1-11

- 127) Bouvy AP, Klepper M, Kho MM, Boer K, Betjes MG, Weimar W, Baan CC. The impact of induction therapy on the homeostasis and function of regulatory T cells in kidney transplant patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2014 Apr 24. [Epub ahead of print]
- 128) Winstead CJ, Reilly CS, Moon JJ, et al. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells optimize diversity of the conventional T cell repertoire during reconstitution from lymphopenia. *J Immunol* 2010; 184: 4749–4760.
- 129) Yang J, Brook MO, Carvalho-Gaspar M, Zhang J, Ramon HE, Sayegh MH, Wood KJ, Turka LA, Jones ND. Allograft rejection mediated by memory T cells is resistant to regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec 11;104(50): 19954-9.
- 130) Bestard O, Cuñetti L, Cruzado JM, Lucia M, Valdez R, Olek S, Melilli E, Torras J, Mast R, Gomà M, Franquesa M, Grinyó JM. Intragraft regulatory T cells in protocol biopsies retain foxp3 demethylation and are protective biomarkers for kidney graft outcome. *Am J Transplant*. 2011 Oct;11(10):2162-72.
- 131) Noris M, Casiraghi F, Todeschini M, Cravedi P, Cugini D, Monteferrante G, Aiello S, Cassis L, Gotti E, Gaspari F, Cattaneo D, Perico N, Remuzzi G. Regulatory T cells and T cell depletion: role of immunosuppressive drugs. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Mar;18(3): 1007-18.
- 132) Valujskikh A. Memory T cells in allograft rejection. *Adv Exp Med Biol*. 2007;601: 247-56.
- 133) Segundo DS, Fernández-Fresnedo G, Gago M, Beares I, Ruiz-Criado J, González M, Ruiz JC, Gómez-Alamillo C, López-Hoyos M, Arias M. Kidney transplant recipients show an increase in the ratio of T-cell effector memory/central memory as compared to non transplant recipients on the waiting list. *Transplant Proc*. 2010 Oct;42(8):2877-9

- 134) Popow I, Leitner J, Grabmeier-Pfistershammer K, Majdic O, Zlabinger GJ, Kundi M, Steinberger P. A comprehensive and quantitative analysis of the major specificities in rabbit antithymocyte globulin preparations. *Am J Transplant*. 2013 Dec;13(12):3103-13.
- 135) Popow I, Leitner J, Majdic O, Kovarik JJ, Saemann MD, Zlabinger GJ, Steinberger P. Assessment of batch to batch variation in polyclonal antithymocyte globulin preparations. *Transplantation*. 2012 Jan 15;93(1):32-40.
- 136) Cicora F, Mos F, Paz M, Roberti J. Clinical experience with thymoglobulin and antithymocyte globulin-Fresenius as induction therapy in renal transplant patients: a retrospective study. *Exp Clin Transplant*. 2013 Oct;11(5):418-22
- 137) Schnetzler B, Leger P, Völp A, Dorent R, Pavie A, Gandjbakhch I. A prospective randomized controlled study on the efficacy and tolerance of two antilymphocytic globulins in the prevention of rejection in first-heart transplant recipients. *Transpl Int*. 2002 Jun;15(6):317-25.
- 138) Terasako K, Sato K, Sato M, Kimura S, Nakasone H, Okuda S, Kako S, Tanaka Y, Yamazaki R, Oshima K, Tanihara A, Higuchi T, Nishida J, Kanda Y. The effect of different ATG preparations on immune recovery after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for severe aplastic anemia. *Hematology*. 2010 Jun;15(3):165-9.