



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**“Generación y expansión de células T reguladoras tipo 1 (Tr1)
aloespecíficas con potencial terapéutico”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

BIOLOGO SAÚL ARTEAGA CRUZ

**Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM**

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Rosana Pelayo Camacho
Instituto Mexicano del Seguro Social

Dra. Paula Licon Limón
Instituto de Fisiología Celular (UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Ciudad de México. Enero, 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

El presente trabajo de investigación fue apoyado por el proyecto CONACYT-FOSISS convocatoria 2016 #272518. Fue apoyado con beca CONACYT con #CVU: 773064. Estancia de investigación en University Medical Center Hamburg-Eppendorf (UKE), Hamburgo, Alemania apoyada por el Programa de Apoyo a los estudios del Posgrado (PAEP). Toda la investigación contenida en esta tesis fue realizada en los laboratorios A107 y A009 del departamento Inmunología del Instituto de investigaciones Biomédicas (IIB), UNAM. Se agradece al Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1. Trasplante de órganos.....	5
2.2. Bases del Alorreconocimiento.....	6
2.3. Vías de alorreconocimiento.....	8
2.4. Rechazo hiperagudo, agudo y crónico.....	11
2.5. Papel de la Respuesta inmune innata en el rechazo a trasplante.....	14
2.6. Papel de la Respuesta inmune adaptativa.....	16
2.6.1. Linfocitos B.....	16
2.6.2. Linfocitos T.....	17
2.7. Fármacos inmunosupresores.....	21
2.7.1. Fármacos de inducción.....	23
a) Globulina anti-timocito (ATG).....	23
b) Antagonistas del receptor de IL-2 (Basiliximab y Daclizumab).....	23
2.7.2. Fármacos de mantenimiento.....	25
a) Inhibidores de la Calcineurina.....	25
2.8. Linfocitos T reguladores (Treg).....	30
2.9. Efecto de los fármacos inmunosupresores sobre las células T reguladoras.....	35
2.10. Treg en la inmunoterapia.....	38
2.11. Células T reguladoras tipo 1 (Tr1).....	42
2.12. DC ₁₀	45
2.13. Receptores ILT.....	46
2.14. HLA-G.....	48
2.15. IL-10.....	50
2.15.1 Identificación de la IL-10.....	50
2.15.2 IL-10 como citocina anti-inflamatoria.....	51
2.16. Tr1 como terapia celular.....	53
2.17. Requerimientos para la terapia celular.....	56
2.18. Protocolo de inducción de Tr1 humanas <i>in vitro</i>	59
3. JUSTIFICACIÓN.....	62
4. HIPÓTESIS.....	63
5. OBJETIVOS.....	64

5.1. Objetivos particulares.....	64
6. METODOLOGÍA.....	65
6.1. Sujetos.....	65
6.2. Separación de células mononucleares de sangre periférica.....	65
6.3. Crio-preservación de PBMCs.....	65
6.4. Purificación de monocitos (CD14 ⁺) por selección positiva.....	66
6.5. Diferenciación de DC ₁₀ (CD11c ⁺ CD14 ⁺ HLA-G ⁺ ILT4 ⁺).....	66
6.6. Fenotipo de DC ₁₀ por citometría de flujo.....	67
6.7. Tinción con CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester).....	67
6.8. Diferenciación de Tr1.....	67
6.9. Purificación de Tr1 (CD4 ⁺ IL-10 ⁺ CD49b ⁺ LAG-3 ⁺).....	68
6.10. Expansión de Tr1.....	68
6.11. Ensayo de expansión.....	69
6.12. Análisis estadístico.....	69
7. RESULTADOS.....	71
7.1. Diferenciación de DC ₁₀	71
7.2. Diferenciación <i>in vitro</i> de Tr1 aloespecíficas.....	73
7.3. Cinética de diferenciación de Tr1 aloespecíficas.....	79
7.4. Ensayo de supresión.....	83
7.5. Purificación de Tr1 (CD4 ⁺ CD49b ⁺ LAG-3 ⁺ IL-10 ⁺).....	86
7.6. Expansión de Tr1.....	88
8. DISCUSIÓN.....	90
9. CONCLUSIONES.....	96
10. PERSPECTIVAS.....	96
11. LITERATURA CITADA.....	97

ABREVIATURAS

GODT: *Global Observatory on Donation and Transplantation*

TCR: Receptor de los linfocitos T

mHAgS: antígenos menores de histocompatibilidad

MCH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

HLA: Antígeno Humano Leucocitario

ADN: Ácido desoxirribonucleico

GVHD: enfermedad de injerto contra huésped

APC: Célula presentadora de antígeno

DCs: Células dendríticas

SCID: Inmunodeficiencia severa combinada

Ab: anticuerpo

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño

PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones

TLRs: Receptores tipo toll

IL-6: Interleucina 6

IFN- γ : Interferón gamma

IL-2: Interleucina 2

Treg: Células T reguladoras

CTLs: Linfocitos T citotóxicos

IL-17: Interleucina 17

NKs: Células asesinas naturales

CNI: Inhibidores de calcineurina

CsA: Ciclosporina

Tac: Tracolimus

ATG: *Anti-thymocyte Globolin*

mAb: anticuerpos monoclonales

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

LAM: Linfangioleiomiomatosis

TSC: Complejo de esclerosis tuberosa

Tn: Células T naïve

IDO: indolamina 2,3-dioxigenasa

Tr1: Células T reguladoras tipo-1

PD-L1: *programmed death 1 ligand*

rh: *recombinant human*

IL-10: Interleucina 10

GM-CSF: Factor estimulante de crecimiento de granulocitos-macrófagos

IL-4: Interleucina 4

CSIF: Factor inhibidor de la producción de citocinas

IL-10R: Rceptor de Interleucina 10

IL-T4: *Immunoglobulin-like Transcript 4*

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica

PBS: Buffer Salino de Fosfatos

SFB: Suero Fetal Bovino

DMSO: Dimetil-sulfóxido

FITC: Isotianato de Fluoresceína

APC-CY7: Allophycocyanin Cy7

PE-CY5: Phycoerythrin Cy5

CFSE: Carboxyfluorescein succinimidyl ester

SEB: Enterotoxina B de *Staphylococcus*

IDC: Células dendríticas irradiadas

LAG-3: *Lymphocyte-activation gene 3*

IR: Incremento relativo

KO: knock out

RPM: Rapamicina

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Tabla 1. Estimación del número de órganos trasplantados a nivel mundial reportados hasta el año 015.....	3
Figura 1. Estadísticas de receptores en lista de espera.....	4
Figura 2. Trasplante renal en México.....	5
Figura 3. Seguimiento de pacientes post trasplantados.....	5
Figura 4. Vías de alorreconocimiento.....	10
Figura 5. Diferenciación de linfocitos T efectores a partir de linfocitos T naïve.....	18
Figura 6. Principales linajes celulares de la respuesta inmunológica involucrados en el rechazo.....	20
Figura 7. Principales blancos de fármacos inmunosupresores.....	22
Tabla 2. Agentes de inducción más comúnmente utilizados.....	24
Tabla 3. Fármacos de mantenimiento más comúnmente utilizados.....	27
Tabla 4. Causas de mortalidad en pacientes con trasplante renal sometidos a tratamientos inmunosupresores.....	29
Figura 8. Estrategias de supresión de Treg.....	32
Tabla 5. Fármacos inmunosupresores y sus principales efectos sobre linfocitos T	37
Tabla 6. Pruebas clínicas mediante el uso de Treg.....	40
Tabla 7. Receptores ILT.....	47
Tabla 8. Pruebas clínicas mediante el uso de Tr1.....	54
Figura 9. Criterios a considerar para la implementación de terapia celular en pacientes	58
Figura 10. Esquema general metodológico.....	70
Figura 11. Fenotipo de DC ₁₀	72
Figura 12. Control de diferenciación.....	74

Figura 13. Diferenciación de Tr1 con IDC ₁₀	74
Figura 14. Diferenciación de Tr1 con DC ₁₀	75
Figura 15. Diferenciación de Tr1 con DC ₁₀ e IL-10.....	77
Figura 16. Porcentajes de viabilidad y células CD4+CD49b+LAG-3+ obtenidas tras la diferenciación.....	78
Figura 17. Cinética de diferenciación.....	80
Figura 18. Cinética de diferenciación de células Tr1.....	83
Figura 19. Ensayo de supresión.....	84
Figura 20. Índice de división.....	85
Figura 21. Fenotipo de las células diferenciadas.....	87
Tabla 9. Purificación de células Tr1.....	87
Figura 22. Expansión policlonal de Tr1 aloespecíficas.....	88
Figura 23. Estabilidad de fenotipo y producción de IL-10.....	89

1. RESUMEN

La incidencia para el rechazo de órganos sólidos en pacientes trasplantados ha sido reducida gracias a los tratamientos basados en el uso de fármacos inmunosupresores. Sin embargo, el uso prolongado de estos fármacos ha sido asociado con efectos adversos en los pacientes, en su mayoría, debido a sus efectos inespecíficos en el bloqueo general de las respuestas inmunológicas. Actualmente, países como Estados Unidos, han implementado nuevas alternativas terapéuticas, basadas en el uso de células reguladoras con el objetivo de generar tolerancia hacia el injerto y a su vez, disminuir el uso de fármacos inmunosupresores. Entre los principales linajes celulares reguladores investigados para su uso en estas alternativas terapéuticas, los linfocitos T reguladores tipo 1 (Tr1), han destacado por los resultados obtenidos en la generación de tolerancia hacia el injerto. Considerando los resultados positivos obtenidos en pacientes con trasplante renal en países de primer mundo, y tomando en cuenta la problemática en salud pública que representa en México el rechazo renal, en el presente trabajo nos enfocamos en la estandarización de un protocolo para la generación y expansión de linfocitos Tr1 *in vitro* con el objetivo de implementar estas nuevas estrategias en cohortes de paciente mexicanos.

Para cumplir el objetivo, se aislaron monocitos a partir de PBMCs de donadores sanos, y se diferenciaron a Células Dendríticas con capacidad tolerogénica (DC₁₀). El fenotipo de las células se corroboró por citometría de flujo evaluando la expresión de CD14, HLA-G e ILT4, obteniendo un porcentaje de pureza hasta del 90%.

Se estandarizaron las condiciones óptimas para la diferenciación *in vitro* de células Tr1 (CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺) mediante co-cultivos entre linfocitos T naïve (T_n) (CD4⁺CD45RA⁺CD25⁻) aislados por sorting y DC₁₀ alogénicas, con las cuales obtuvimos porcentajes de diferenciación mayores al 60%. Posteriormente, comprobamos la funcionalidad de los linfocitos Tr1 tras su diferenciación, mediante ensayos de supresión tanto policlonales como antígenos específicos. Implementamos un sistema que nos permitió asegurar la purificación por sorting de

Tr1 con un alto porcentaje de pureza, mediante el marcaje de su fenotipo reportado (CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺) y la detección en superficie de IL-10. Finalmente, establecimos una metodología de expansión *in vitro* que no sólo nos permitió aumentar considerablemente los números obtenidos de células Tr1 tras su purificación (casi mil veces con respecto al número inicial de linfocitos Tr1), sino que además nos permite conservar células Tr1 con su fenotipo y producción de citocinas estables (88.2% del total de la población expandida). Mediante las condiciones obtenidas, se podría implementar un protocolo para finalmente ser utilizado como terapia en pacientes mexicanos con trasplante renal o incluso, para continuar con investigaciones que nos permita dilucidar más acerca de la biología de las células Tr1.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Trasplante de órganos

Durante las dos décadas pasadas, el avance en el trasplante de órganos para personas que presentan daño parcial o masivo en algún órgano ha producido un aumento considerable en la calidad y expectativa de vida de los pacientes. Dentro de las principales condiciones clínicas que conducen a la necesidad de un trasplante de órganos se encuentran patologías como; diabetes, insuficiencia irreversible del riñón, corazón o vías respiratorias, entre otras.

De acuerdo con cifras reportadas por la GODT (Global Observatory on Donation and Transplantation), se realizaron 126,670 trasplantes en el año 2015, lo que representa un incremento del 5.8% con respecto a los casos reportados a nivel mundial en el 2014. Dentro de los órganos con mayor demanda se incluyen; hígado, pulmón, corazón, páncreas, intestino delgado y riñón, siendo este último el de mayor demanda (**Tabla 1**).

Riñón	Hígado	Corazón	Pulmón	Páncreas	Intestino delgado
84, 347	27, 759	7, 023	5, 046	2, 299	196

Tabla 1. Estimación del número de órganos trasplantados a nivel mundial reportados hasta el año 2015 (GODT, 2015).

En México, pacientes en espera de un trasplante renal encabezan las listas de demanda de órganos sólidos, superando la demanda incluso de órganos como Córnea e Hígado (**Fig.1**). Además, estadísticas publicadas hasta el tercer trimestre del año 2018, muestran un total de 681 trasplantes renales realizados, lo que representa tan sólo el 4.63% del total de pacientes en espera (**Fig.2**).

Es evidente la importancia clínica que representa el trasplante renal como terapia, sobre todo, en pacientes sometidos previamente a diálisis o hemodiálisis, por causa de alguna enfermedad renal terminal. En la actualidad el trasplante renal, gracias al uso de inmunosupresores (ver más adelante) tiene una tasa de éxito a 5 años de más del 90%, sin embargo, existe una gran probabilidad de que los pacientes trasplantados, desarrollen a largo plazo procesos de rechazo crónico [1], debido al reconocimiento del aloinjerto por parte del sistema inmunológico del paciente hacia el órgano trasplantado (**Fig. 3**) [2].

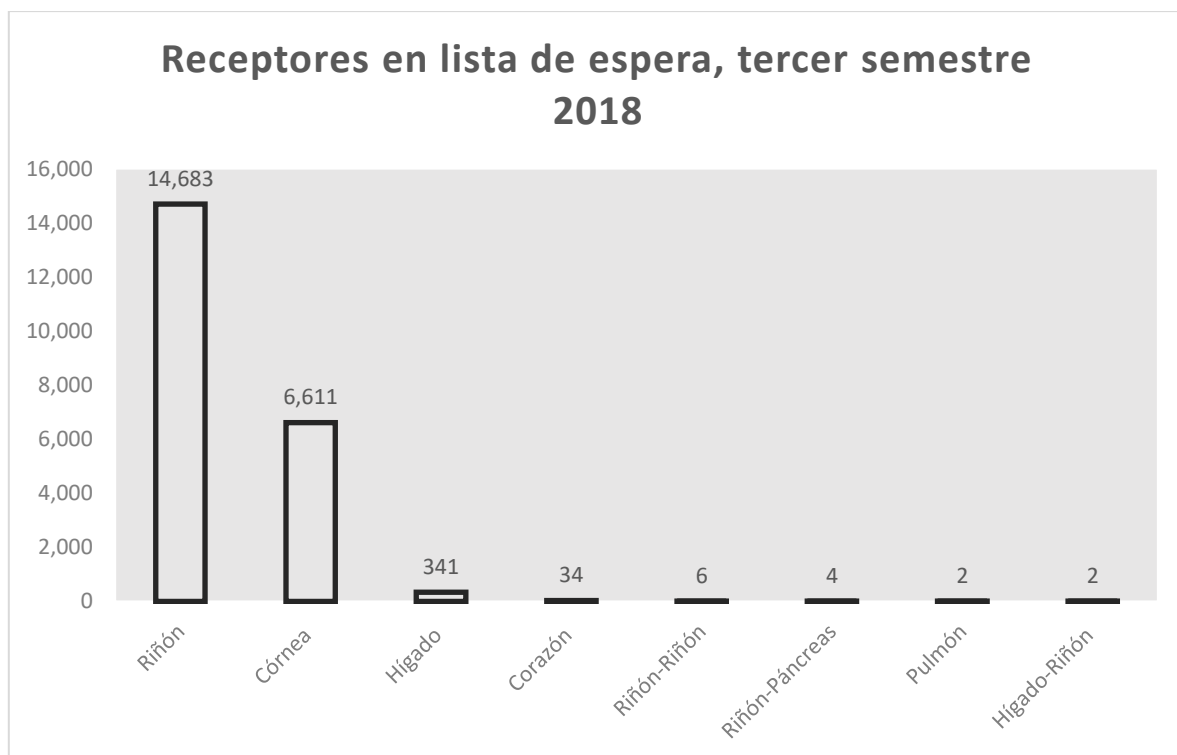


Figura 1. Estadística de receptores en lista de espera. Representación gráfica del número de pacientes en lista de espera de algún órgano en el tercer trimestre del año 2018 (Fuente: Sistema informático del Registro Nacional de trasplantes, corte al 03 de Octubre del 2018).

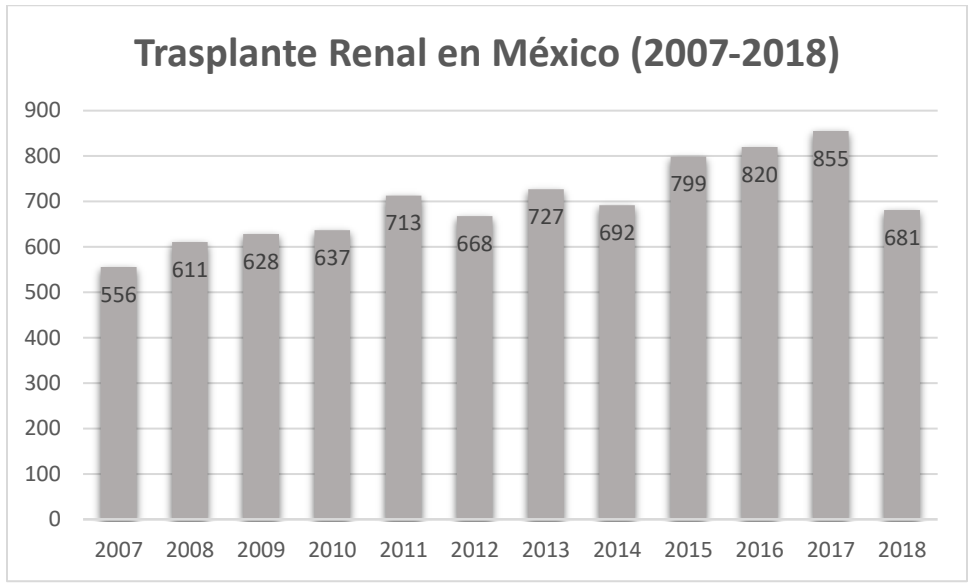


Figura 2. Trasplante Renal en México (2007-2018). Recopilación del número de trasplantes realizados en México desde el 2007 hasta el primer trimestre del 2018 (Fuente: Sistema informático del Registro Nacional de trasplantes, corte al 03 de Octubre del 2018).

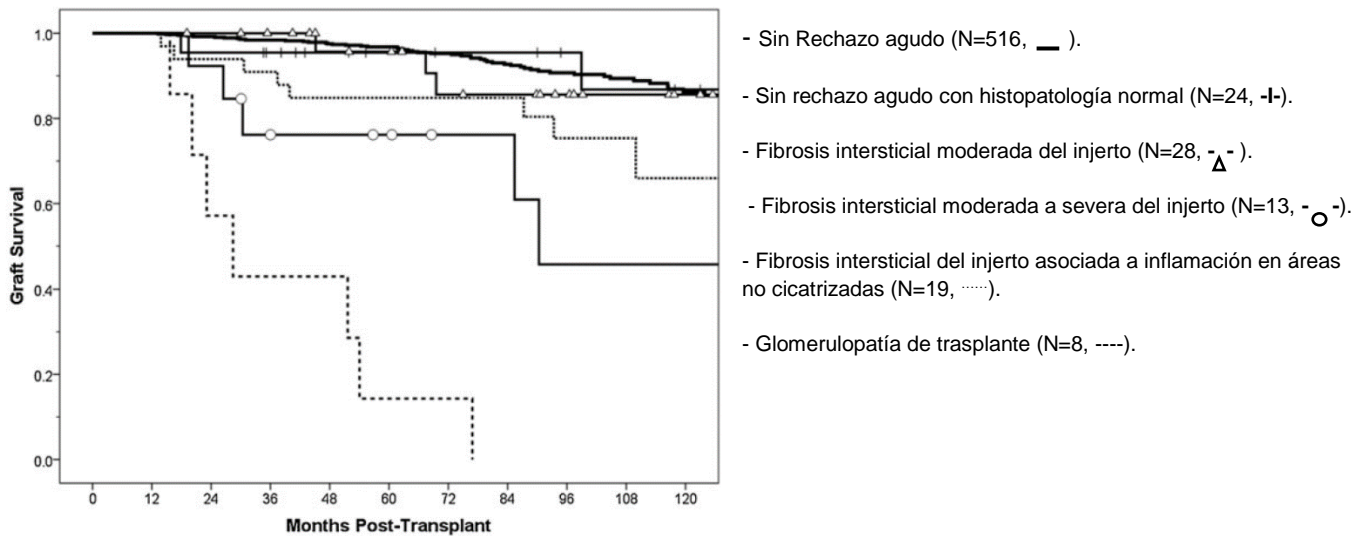


Figura 3. Seguimiento de pacientes post trasplantados. Seguimiento de pacientes con trasplante renal a partir de un año post-trasplante y hasta 10 años. Pérdida progresiva del injerto en diferentes cohortes de pacientes determinada por biopsia de tejido [1].

2.2. Bases del Alorreconocimiento.

El reconocimiento por parte del sistema inmunológico de polimorfismos (aloantígenos) expresados en células, tejidos u órganos trasplantados, entre individuos de la misma especie, pero genéticamente distintos (alogénicos), se define como alorreconocimiento. Particularmente, este proceso es llevado a cabo por linfocitos T [3, 4].

En el proceso de recombinación somática durante el desarrollo de linfocitos T, que se lleva a cabo en el timo, los receptores de linfocitos T (TCR) adquieren una alta especificidad para el reconocimiento de antígenos. La diversidad del TCR se calcula entre un rango aproximado de 9×10^5 tipos diferentes para la cadena β y 4.5×10^5 tipos diferentes para la cadena α . Tomando en cuenta los valores anteriores, se han estimado un total de hasta 2.4×10^7 combinaciones distintas entre las cadenas α y β [5]. Sin embargo, este amplio repertorio es seleccionado en el timo durante los procesos de selección positiva y negativa. La selección positiva, garantiza que los linfocitos T salgan a la periferia con la capacidad de reconocer péptidos presentados por moléculas de MHC propias mediante interacciones de afección baja o intermedia (restricción genética hacia MHC). Esto elimina un 95% de las especificidades posibles, y del 5% que son seleccionados positivamente, es necesario eliminar a aquellos timocitos con capacidad autorreactiva (mediante el proceso de selección negativa). A pesar de que la mayor parte del repertorio reconoce péptidos presentados por MHC propio, existe de un 3-5% de linfocitos T que salen a la periferia con capacidad de reconocer MHC extraño (linfocitos T alorreactivos).

Además, dentro de este amplio repertorio se incluyen alopéptidos derivados de proteínas denominados antígenos menores de histocompatibilidad (mHAgs, por sus siglas en inglés) así como secuencias de aminoácidos (aa) que conforman las moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) alogénicas, también denominado Antígeno Leucocitario Humano (HLA) específicamente para células humanas [6, 7].

Los mHAGs son péptidos derivados de proteínas alélicamente polimórficas presentes en el injerto. Estos mHAGs han sido descritos tanto en ratón como en humano, los cuales son codificados en cromosomas autosómicos, cromosomas sexuales así como en ADN mitocondrial [8]. Debido a la influencia que tienen los mHAGs en la incidencia de procesos de rechazo, ha sido necesaria la inducción de inmunosupresión sistémica en pacientes que incluso presentan un alto porcentaje de compatibilidad entre sus moléculas del MHC con las de su donador, no sólo en trasplante de órganos sólidos si no también en trasplante de células madre, para evitar la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD “Graft versus host disease” por sus siglas en inglés) [9].

Sin embargo, las principales diferencias genéticas entre donador y receptor se localizan en un conjunto de genes altamente polimórficos que codifican proteínas pertenecientes al MHC I y II. Las moléculas del MHC-II se expresan principalmente en la superficie de células presentadoras de antígeno (APC) como las células dendríticas (DCs) y participan en la presentación antigénica mediante su interacción con el TCR [10].

El alorreconocimiento desencadena una serie de procesos inmunológicos de tipo inflamatorios en contra del injerto, en dónde el nivel de respuesta dependerá directamente del grado de variabilidad y polimorfismos genéticos presentes entre las moléculas del receptor y del donador [3, 11, 12].

2.3. Vías de alorreconocimiento

Uno de los principales eventos que provoca los procesos de rechazo mediante respuestas de tipo inflamatorias en contra del injerto, es el alorreconocimiento de moléculas del MHC por parte de su Receptor de Linfocito T (TCR por sus siglas en inglés) específicos, expresados en linfocitos T del receptor (Autólogos), a este proceso se le conoce como **vía de alorreconocimiento directo** [13, 14] **(Fig.4-a)** .

La vía directa es un proceso mediante el cual el del receptor linfocitos T reconoce secuencias peptídicas presentes en las moléculas del MHC intactas expresadas principalmente en la superficie de Células Presentadoras de Antígeno (APC por sus siglas en inglés) alogénicas, principalmente Células Dendríticas (DCs por sus siglas en inglés) que migran hacia los órganos linfoides, sin la necesidad de realizar un procesamiento de antígeno. Se ha estimado que entre el 3-6% del repertorio de linfocitos T presente en un individuo cuenta con un TCR específico para péptidos presentes en moléculas del MHC I o II alogénicas [15-17]. Este proceso sólo ocurre durante las primeras semanas tras haber realizado el trasplante, durante las cuales las APCs alogénicas permanecen viables [7].

La vía directa del alorreconocimiento, fue descrita por primera vez por Bain *et al.* En su trabajo demostró que al cocultivar leucocitos provenientes de 2 individuos genéticamente distintos *in vitro*, podía observarse un gran porcentaje de activación en ellos, pero si por el contrario, se realizaban los cocultivos con leucocitos provenientes de individuos genéticamente iguales o con una alta compatibilidad, no se observaba esta activación celular [18].

Posteriormente, Lafferty *et al.* proporcionaron fuertes evidencias de este proceso al realizar ensayos *in vivo* de trasplante de tiroides entre ratones incompatibles, en los cuales se observó que al cabo de poco tiempo de realizar el injerto, los ratones receptores desarrollaban procesos de rechazo que terminaban en muchos casos con la muerte del receptor, por el contrario, si las poblaciones leucocitarias eran removidas del injerto, la vida del ratón podía ser prolongada hasta por 12 días posteriores al trasplante, sin embargo estos ensayos no evidenciaban claramente

la participación directa entre las moléculas MHC alogénicas y los linfocitos T del receptor [19].

La primera evidencia concreta de la vía de alorreconocimiento directa, se demostró mediante ensayos en modelos de inmunodeficiencia severa combinada (SCID por sus siglas en inglés) o ratones Rag1 KO, los cuales eran reconstituidos con linfocitos T CD4⁺ singénicos, y posteriormente eran trasplantados con injertos cardiacos provenientes de ratones normales “Wild type” y ratones deficientes de moléculas MHC II. Observaron que únicamente en los ratones con los injertos provenientes de los ratones deficientes de MHC-II, no se presentaba rechazo en contra del injerto, estos ensayos demostraron la capacidad de los linfocitos T CD4⁺ para reconocer directamente moléculas MHC alogénicas [3, 20, 21].

Por otra parte, existe una segunda vía de alorreconocimiento denominada **vía de alorreconocimiento indirecta**. Tras haber realizado el trasplante, las APCs autólogas infiltran el órgano o tejido trasplantado, dónde reconocen, capturan y procesan aloantígenos, posteriormente migran hacia los órganos linfoides dónde presentan estos alo péptidos a linfocitos T_H, que al activarse llevan a cabo la respuesta en contra del injerto **(Fig. 4-b)** [7][16][22].

La evidencia más concreta que demostró los procesos de la vía indirecta fueron los trabajos realizados por Auchincloss *et al.* Ellos observaron que tras realizar injertos de piel provenientes de ratones deficientes de moléculas MHC II en ratones deficientes de moléculas MHC I, los receptores presentaban rechazo del injerto aún en ausencia de una respuesta mediada por linfocitos citotóxicos, lo que sugirió que los procesos de rechazo eran mediados por linfocitos T CD4⁺, los cuales habían reconocido alo péptidos presentados en moléculas de MHC II por parte de APCs autólogas [23].

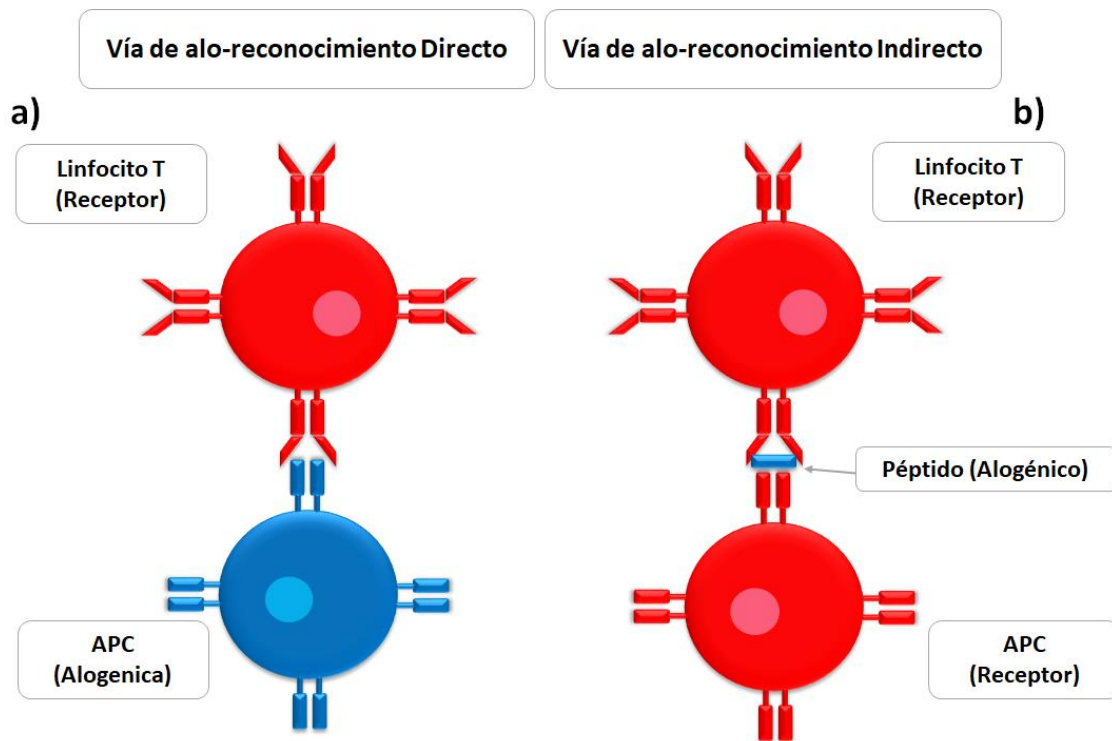


Figura 4. Vías de alorreconocimiento: a) Vía de alorreconocimiento directo: reconocimiento del MHC alogénico por parte de un linfocito T del receptor. b) Vía de alorreconocimiento Indirecto: Las APCs del receptor presentan péptidos alogénicos a los linfocitos T del receptor.

Una vez que se ha llevado a cabo el alorreconocimiento ya sea por la vía directa o indirecta, el sistema inmunológico inicia respuestas en contra del injerto, que terminan por comprometer su integridad física y funcional, a este proceso se le conoce como rechazo. El proceso de rechazo ha sido clasificado en 3 diferentes categorías: 1) **el rechazo hiperagudo**; 2) **el rechazo agudo**, y por último, 3) **el rechazo crónico**, diferenciados por los mecanismos implicados y el tiempo en el que se desarrollan [24].

2.4. Rechazo hiperagudo, agudo y crónico.

El **rechazo hiperagudo** se presenta en los primeros minutos posteriores al trasplante y sólo ocurre en casos de individuos previamente sensibilizados, es decir, sólo ocurre si el receptor estuvo previamente expuesto a aloantígenos. Se produce en injertos vascularizados, y es causado principalmente por el desarrollo de trombosis en los vasos sanguíneos que irrigan al injerto, provocando muerte por necrosis. Esta respuesta está mediada por anticuerpos (Abs por sus siglas en inglés) preformados que reconocen el aloinjerto. La presencia de anticuerpos IgG anti HLA en pacientes, comúnmente es atribuido a injertos fallidos o transfusiones sanguíneas realizados previamente, así como embarazos [25, 26].

Una de las principales consecuencias de la presencia de Abs es la activación del sistema de Complemento el cual juega un importante papel en el rechazo hiperagudo. Se ha descrito en modelos de xenoinjertos que el sistema de Complemento se activa y ejerce su función inmediatamente tras vascularizar el injerto; en cambio, injertos realizados entre animales deficientes del sistema de Complemento, mostraron un mantenimiento prolongado del xenoinjerto, demostrando la participación central que tiene el sistema de Complemento en el rechazo hiperagudo [27].

Por otra parte, estos anticuerpos pre-formados promueven la secreción del factor procoagulante Von Willebrand en células endoteliales tras ser estimuladas con estos anticuerpos, dando como resultado la adhesión y agregación de plaquetas, bloqueando así las principales vías de vascularización que alimentan al injerto y finalmente provocando una condición denominada isquemia [28].

La presencia de estos anticuerpos y la posterior activación tanto del sistema de Complemento como de las células epiteliales que secretan factores de coagulación, generan en conjunto una serie de reacciones que desembocan en el desarrollo de lesiones y en la pérdida del injerto [11].

Actualmente, la frecuencia de este tipo de rechazo ha sido altamente disminuida debido a los estudios de compatibilidad así como estudios para la identificación de la presencia de anticuerpos que reconozcan elementos del injerto (HLA) por medio de técnicas de compatibilidad cruzada entre células del donador y del receptor, realizados previos al trasplante [29].

El rechazo agudo puede presentarse en la primera semana o bien en los primeros meses tras haberse realizado el trasplante. Se caracteriza por una respuesta inmunológica específicamente dirigida en contra del injerto. Para el diagnóstico de este tipo de rechazo, en el caso particular del trasplante renal, existen métodos basados en el análisis tanto del nivel de daño, así como la identificación de poblaciones celulares infiltradas en muestras de tejido del injerto tomadas mediante biopsias o mediante análisis histológicos. A partir de estas pruebas, los resultados son comparados mediante un sistema de clasificación publicado en el 2012 denominado “Banff” [30, 31].

Las principales respuestas del sistema inmune que efectúan el rechazo en contra del injerto son mediadas por los linfocitos T y linfocitos B. El reconocimiento por parte de linfocitos T o B de antígenos presentes en moléculas MHC alogénicas (vía directa) representa el principal detonante de este tipo de rechazo [30, 31].

Sin embargo, actualmente la incidencia en casos reportados de rechazo agudo ha disminuido incluso a valores por debajo del 15% gracias a las estrategias implementadas como son las terapias de inducción, basadas en el uso de fármacos inmunosupresores en pacientes pre-trasplantados [29].

Finalmente, **el rechazo crónico** es el tipo de rechazo que se desarrolla en un mayor periodo de tiempo, puede llevarse a cabo incluso durante el transcurso de varios años. Histopatológicamente, el rechazo crónico en trasplante renal se manifiesta con una progresiva oclusión vascular, glomerulopatías, así como procesos de fibrosis intersticial, acompañadas de atrofia tubular, que dan como resultado la pérdida del órgano [32]. Este tipo de rechazo encabeza la incidencia en los pacientes con trasplante y se caracteriza por presentar respuestas de tipo humoral o mecanismos celulares de memoria en donde intervienen principalmente

respuestas mediadas por linfocitos T y B [33] [11]. Incluso evitando el surgimiento del rechazo agudo mediante la implementación de terapia de inducción, la probabilidad de presentar respuestas características del rechazo crónico incrementa considerablemente. El rechazo crónico es el principal causante de la pérdida de órganos sólidos trasplantados, principalmente afectando riñón, corazón e hígado [33]. Las lesiones vasculares obstructivas características en este rechazo son causadas por un constante y progresivo daño en el endotelio vascular que da como resultado una hiperproliferación e hipertrofia [34]. Los principales mecanismos inmunológicos que ocurren durante el rechazo son: a) la respuesta inespecífica mediada por el sistema inmune innato, a la que también denominamos, fase temprana y b) la respuesta donador-específica, que se da posterior a la respuesta temprana y en donde participan elementos del sistema inmune adaptativo tras el reconocimiento de aloantígenos.

2.5. Papel de la Respuesta inmune innata en el rechazo al trasplante

La mayor parte de la información publicada con respecto a procesos de alo-reconocimiento se enfoca en aquellos realizados por linajes celulares pertenecientes al sistema inmune adaptativo, sin embargo, recientemente han surgido trabajos que evidencian la participación que tienen las células del sistema inmune innato en estos procesos.

El sistema inmune innato es el encargado de montar la primera línea de defensa durante algún proceso que comprometa la integridad del hospedero. Esta respuesta se lleva a cabo a través del reconocimiento de moléculas altamente conservadas derivadas de algunos microorganismos o de daño, denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs por sus siglas en inglés) respectivamente, mediante receptores expresados en la superficie celular denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs por sus siglas en inglés) [35, 36].

Algunos investigadores han reportado que las funciones de los PRRs también intervienen en el reconocimiento de moléculas derivadas del hospedero expuestas durante el daño hacia algún tejido [36].

Los receptores tipo Toll (TLRs por sus siglas en inglés) son los miembros mejor estudiados pertenecientes a la familia de los PRRs. Los TLRs se expresan en una gran variedad de células de sistema inmune, por ejemplo, DCs, linfocitos B, mastocitos, células endoteliales, células parenquimáticas, linfocitos, entre otras [36].

La familia de los PRRs cuentan con una gran variedad de miembros como los anteriormente mencionados, con un importante papel en el reconocimiento no sólo de agentes microbianos sino que, recientemente, se ha descrito su capacidad para reconocer e iniciar una respuesta hacia moléculas expuestas como resultado de daño a tejidos, causado por isquemia o reperfusión durante el trasplante de órganos sólidos [36], dando como consecuencia el rechazo hacia el aloinjerto [37] [24].

Kupiec-Weglinski, determinó por medio de un modelo de lesión en hígado causada por isquemia/reperfusión, la implicación de una respuesta en contra del órgano,

mediada por el reconocimiento y señalización del TLR4 expresado en DC, linfocitos B, mastocitos entre otros linajes celulares [35, 38]. Otro estudio realizado por Tsung *et al.* demuestra la implicación de fagocitos derivados de células hematopoyéticas en el reconocimiento de moléculas expuestas por daño a tejido mediante su TLR4 [39]. Otros linajes celulares que se han visto implicados en este tipo de respuestas, son los macrófagos, los cuales tras la inducción de daño a tejido en un modelo murino, inician una respuesta mediante la secreción de citocinas pro-inflamatorias [24].

2.6. Papel de la Respuesta inmune adaptativa.

2.6.1. Linfocitos B

La respuesta mediada por elementos celulares del sistema inmunológico adaptativo inicia posterior a la respuesta temprana del sistema inmunológico innato y, a diferencia de la respuesta temprana, ésta se caracteriza por tener alta especificidad hacia aloantígenos presentes en las células del injerto.

La participación de linfocitos B en los procesos de rechazo, se demostró mediante modelos de ratones deficientes de células B, los cuales tras realizar un injerto de piel, se observó que los procesos de rechazo comenzaban en tiempos posteriores en comparación con ratones wild type con injerto de piel y además, se observó que los procesos de rechazo podían ser reactivados tras la administración de suero hiperinmune en los ratones deficientes de linfocitos B [40] [41].

La importancia en procesos de rechazo por parte de linfocitos B en humano también ha sido demostrada, con base en que en pacientes tratados con terapias para la depleción de linfocitos B, se obtiene una disminución en los eventos de rechazo al órgano trasplantado, lo que demuestra el papel que tienen los linfocitos B como amplificadores de la respuesta en contra del injerto [29].

La importancia de los linfocitos B en procesos de rechazo radica en sus capacidades como presentadoras de antígeno y producción citocinas que favorece la activación y diferenciación de linfocitos T CD4⁺ efectores e incluso de memoria, así como la producción anticuerpos anti-HLA del donador [42, 43].

2.6.2. Linfocitos T

La respuesta mediada por linfocitos T, como se mencionó anteriormente, requiere de la presentación y reconocimiento (vía directa o indirecta) de aloantígenos por parte de APCs, principalmente de DCs, que pueden ser autólogas o alogénicas [16, 44].

Aunque los linfocitos T son los principales responsables de ejercer el daño en contra del injerto, se ha comprobado en modelos de trasplante, que esta respuesta depende completamente de la presencia de DCs. Lachler y Batchelor comprobaron en sus experimentos que dentro de estas poblaciones leucocitarias presentes en los injertos, existía una que jugaba un papel principal en éstos procesos de rechazo y estas células eran las DCs, ya que al eliminar las DCs del aloinjerto, su tiempo de supervivencia aumentaba considerablemente [45]

El papel de las DCs toma importancia poco después de realizar el trasplante, ya que las DCs alogénicas migran hacia órganos linfoides secundarios donde pueden iniciar la presentación de los alo péptidos a linfocitos T, principalmente a linfocitos T CD4⁺. Una vez activados, los linfocitos T CD4⁺ efectores, migran hacia el sitio de localización del injerto y una vez ahí, los linfocitos identifican su aloantígeno e inician una secuencia de señales que culminan con la secreción de quimiocinas que ayudarán a reclutar a otras poblaciones efectoras, y distintas citocinas pro-inflamatorias (IL-6, IFN- γ e IL-2 entre otras) que estimularán la activación, funciones efectoras (como la secreción de anticuerpos por parte de los linfocitos B) y la proliferación de otras células inmunes reclutadas como macrófagos o neutrófilos, dando como resultado necrosis en el tejido del órgano trasplantado. Además, el reclutamiento de células efectoras también conduce a la muerte de las células epiteliales y endoteliales del órgano a través del contacto célula con célula mediante distintos mecanismos de citotoxicidad [46-48].

Los linfocitos Tn pueden diferenciarse en distintos linajes efectores (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 etc.) o en linajes reguladores (Treg Foxp3⁺, Tr1, Th3 entre otras) (**Fig. 5**), dependiendo del microambiente en el que se lleve a cabo la activación tras ser estimulados con las DCs; por ejemplo, en ambientes ricos en IL-2 e IFN- γ , se favorecerá diferenciación de linfocitos Tn hacia el linaje Th1, los cuales están involucrados en estimular las respuestas humorales por parte de linfocitos B así como la activación de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL por sus siglas en inglés), o en ambientes ricos en IL-6, IL-23 y TGF- β se favorecerá la diferenciación al linaje Th17, los cuales están involucrados en el reclutamiento de células como neutrófilos, NK, macrófagos, entre otras poblaciones celulares. potenciando así los procesos de rechazo en contra del órgano trasplantado (**Fig. 6**) [38, 49].

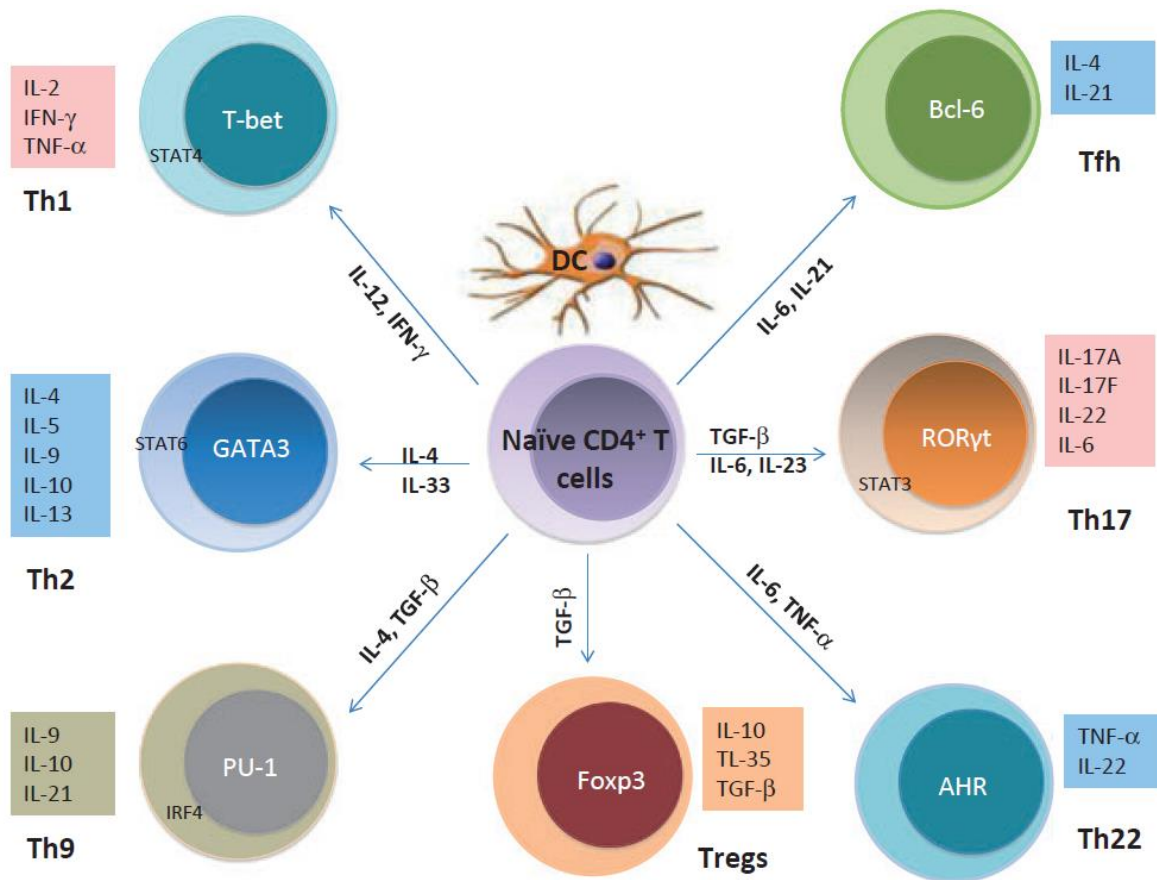


Figura 5. Diferenciación de linfocitos T efectores a partir de linfocitos Tn. Diferenciación de los principales linajes efectores dentro de los linfocitos T CD4⁺ (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh y Tregs, principalmente) tras su activación por parte de Células Dendríticas, de acuerdo al perfil de citocinas presentes en el microambiente [50].

En el caso de los linfocitos T CD8⁺ los cuales pueden ser diferenciados a linfocitos T citotóxicos (CTLs), su diferenciación a partir de linfocitos T CD8⁺ naïve puede ser promovida no sólo por las señales de activación provistas por las DCs, sino que también esta diferenciación se ve potenciada por la acción de linfocitos T CD4⁺efectores, gracias a las citocinas que proporcionan al medio (IL-2/IFN- γ) o vía contacto célula con célula [51]. Una vez que los linfocitos CD8⁺ han sido provistos tanto de las señales como de los estímulos necesarios y alcanzan su maduración a CTLs, estos migran en busca del órgano trasplantado, donde reconocen los antígenos blanco presentes en este (moléculas de MHC-I), e inician sus mecanismos citotóxicos, basados principalmente en la secreción de granzima B y perforina, o por la vía de Fas/FasL, lo que conduce a la pérdida del órgano [38, 49].

Por otro lado, las células T de memoria también juegan un importante papel en las respuestas en contra del injerto; de hecho, las respuestas mediadas por linfocitos T de memoria se inducen con más efectividad, incluso después de una estimulación débil. Linfocitos T CD8⁺ de memoria pueden diferenciarse y actuar rápidamente en contra del órgano trasplantado lisando directamente sus células [52].

La existencia de linfocitos T de memoria específicos al HLA del donante en pacientes pre-trasplantados se atribuye a transfusiones de sangre, embarazos o trasplantes realizados previamente que presentaron procesos de rechazo, aunque se han presentado casos de pacientes con linfocitos T de memoria específicos al HLA del donador sin haber estado expuesto previamente a alguna de las condiciones anteriores [52]. Estudios realizados en pacientes con trasplante de hígado y de riñón han demostrado que aquellos individuos que presentan linfocitos T CD8⁺ de memoria específicos al HLA del donador, rechazan en poco tiempo el órgano trasplantado [38, 49].

Actualmente, los procesos de rechazo hiperagudo y agudo en pacientes con aloinjertos han sido controlados mediante estrategias terapéuticas basadas en el uso de fármacos inmunosupresores que detienen las respuestas tanto del sistema inmune innato como del sistema inmune adaptativo [38, 49].

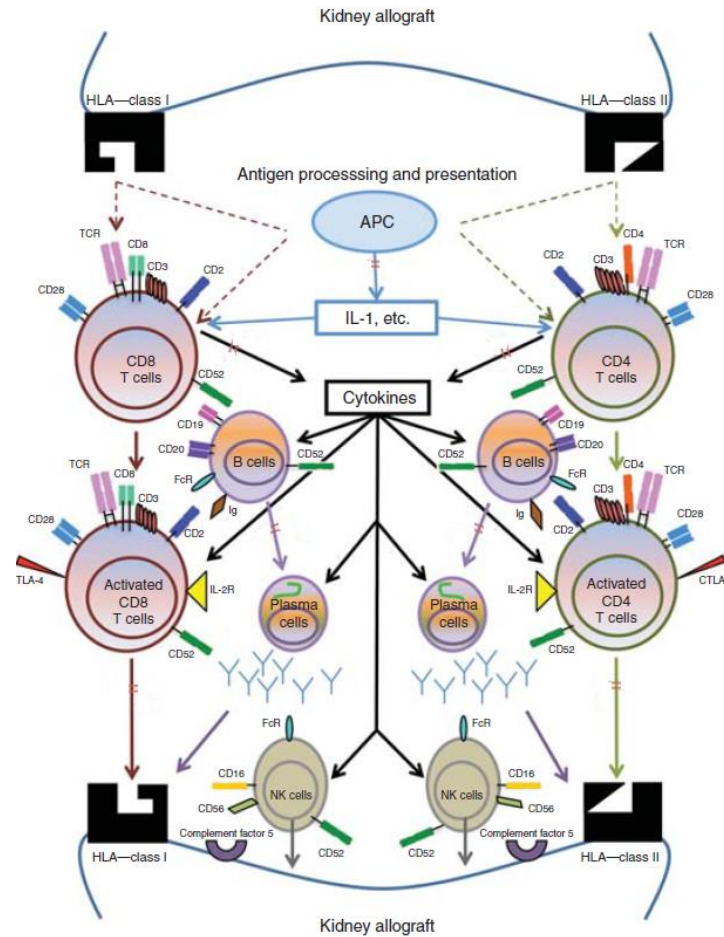


Figura 6. Principales linajes celulares de la respuesta inmune involucrados en el rechazo. Linajes celulares involucrados en la respuesta inmune en contra del injerto, entre las que destacan aquellas mediadas por los linfocitos T CD4⁺, CD8⁺, Linfocitos B en la producción de Anticuerpos de la respuesta adaptativa, y Nks así como sistema de Complemento por parte del sistema innato.

2.7. Fármacos inmunosupresores

En mayor o menor nivel, el rechazo al órgano trasplantado es casi inevitable, a no ser que exista una compatibilidad genética cercana al 100% entre el donante y el receptor, condición que sólo es posible entre gemelos idénticos. Para el resto de los casos, que representan la mayoría, es necesaria la inducción de tratamientos con drogas inmunosupresoras que eviten tanto las respuestas mediadas por el sistema inmune innato como aquellas mediadas por el sistema inmune adaptativo en contra del injerto, prolongando así el mantenimiento del injerto [53].

A partir de 1980, surgen los primeros fármacos destinados a prolongar la vida media de los injertos, revolucionando el área de trasplante de órganos. La Azatioprina, y los glucocorticoides fueron las primeras drogas inmunosupresoras aprobadas para su uso terapéutico y, tiempo después, los inhibidores de Calcineurina (CNI), Ciclosporina A (CsA) y Tacrolimus (Tac) marcaron el comienzo de una mejor esperanza de vida en los pacientes post-trasplante [54].

Actualmente, existen un gran número de fármacos inmunosupresores utilizados como la principal alternativa terapéutica para la prevención del rechazo al injerto, cada uno clasificado de acuerdo a la molécula blanco contra la cual actúa en alguna de las vías de señalización y/o metabólicas importantes de las células del sistema inmune, evitando así la activación, crecimiento o incluso induciendo la muerte de las células blanco [54].

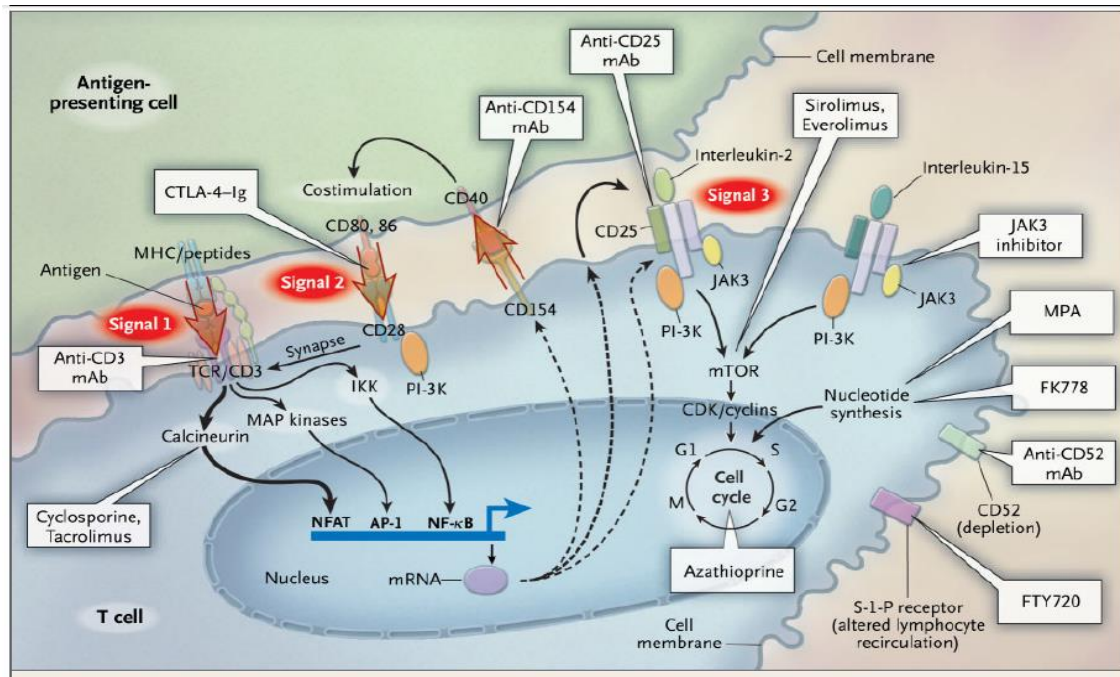


Figura 7. Principales blancos de fármacos inmunosupresores: Moléculas que son afectadas por fármacos, estas moléculas intervienen en las principales vías de señalización y metabólicas de linajes celulares del sistema inmunológico [54].

Dentro de los principales blancos de estos fármacos se encuentran moléculas importantes implicadas en el metabolismo de linfocitos T y B, ya que estos representan uno de los principales linajes celulares involucrados en los procesos de rechazo (**Fig. 7**).

Los fármacos inmunosupresores pueden ser clasificados en agentes de inducción o de mantenimiento. Los agentes de inducción se encargan de eliminar todos aquellos componentes celulares de memoria, así como aquellos componentes que forman parte del sistema inmune innato y que podrían actuar en contra del injerto. Estos tratamientos de inducción se enfocan en abatir las respuestas por parte de linfocitos B (producción de anticuerpos), linfocitos T, DCs, NKs, así como la activación del sistema de complemento, principalmente [55].

2.7.1. Fármacos de inducción

a) Globulina anti-timocitos (ATG)

Es uno de los principales agentes de inducción utilizados. Se produce mediante la inmunización de conejos o caballos con timocitos humanos para posteriormente obtener anticuerpos policlonales anti-timocitos (ATG por sus siglas en inglés) [56]. El ATG se caracteriza por eliminar linfocitos T, así como linfocitos B, DCs, NKs, células endoteliales entre otras [57]. Este agente es muy utilizado en pacientes pre-trasplante que presentan un alto riesgo de rechazo hiperagudo y agudo. A partir del uso del ATG se ha reducido la incidencia de rechazo hiperagudo y agudo a menos del 11%, por lo que continua siendo uno de los principales agentes de inducción [53].

b) Antagonistas del receptor de IL-2 (Basiliximab y Daclizumab)

Los antagonistas del receptor de IL-2 son anticuerpos monoclonales (mAb por sus siglas en inglés) dirigidos a la cadena α del receptor de IL-2 (CD25); específicamente, el Basiliximab es un mAb quimérico, a diferencia del Daclizumab que es un mAb humanizado. Ambos anticuerpos fueron aprobados para su uso en la prevención del rechazo agudo en pacientes con trasplante renal [58].

La IL-2 es una citocina necesaria principalmente para linfocitos T. La cadena α (CD25) del receptor para IL-2 es sólo una parte del complejo del receptor conformado por 3 cadenas (α , β y γ). CD25 en conjunto con la cadena β forman el sitio de unión para su ligando la IL-2, los cuales al asociarse, desencadenan una serie de señales intracelulares necesarias para la activación, proliferación y mantenimiento en los linfocitos T [59]. En el contexto de rechazo, la IL-2 juega un papel muy importante ya que favorece las respuestas en contra del injerto, principalmente al ser utilizada por los CTLs, linfocitos T CD4⁺ efectores e incluso linfocitos B específicos para los aloantígenos. Por ello, los mAb antagonistas del receptor de IL-2, bloquean la unión del ligando con su receptor al unirse directamente a la cadena α del receptor, bloqueando así toda la señalización intracelular. Sin embargo, estos tratamientos tienen algunas limitantes, como sus

cortos periodos de vida media en circulación, así como el desarrollo de Abs anti-mAb antagonistas por parte del paciente, lo que disminuye su efectividad [60] [61, 62].

A partir del surgimiento de estos agentes de inducción surgieron mucho otros fármacos como Alemtuzumab o el Muromonab-CD3, basados en mAb cuyos blancos se resumen en la **tabla 2**.

Agente de inducción	Mecanismo de acción
rATG	Anticuerpos policlonales anti CD2, CD4, CD8, CD11a, CD18, CD25, CD44, HLA-DR, cadena pesada de HLA.
Basiliximab	Anticuerpo quimérico humano o murino monoclonal IgG _{1k} anti CD25
Alemtuzumab	Anticuerpo monoclonal humanizado IgG _{1k} anti CD52
Muromonab-CD3 (OKT3)	Anticuerpo monoclonal murino anti CD3

Tabla 2: Agentes de inducción más comúnmente utilizados en pacientes pre trasplantados basados en anticuerpos monoclonales o policlonales así como sus blancos específicos (modificado de [53]).

2.7.2. Fármacos de mantenimiento

El segundo tipo de fármacos inmunosupresores son aquellos denominados de mantenimiento, estos se administran a los pacientes posterior al trasplante, durante periodos de tiempo muy largo o incluso de por vida, con el objetivo de disminuir el peligro de presentar procesos de rechazo agudo y de esta manera aumentar la mortalidad y calidad de vida en los pacientes, se ha comprobado que aproximadamente el 95% de los pacientes sometidos a estos tratamientos muestran un buen pronóstico y calidad de vida, al menos por los primeros 2 años post-trasplante [63].

A) Inhibidores de Calcineurina (CNI)

La Ciclosporina A (CsA) es un péptido cíclico no ribosómico de 11 aa, este péptido fue purificado del hongo *Tolypocladium inflatum*. La CsA tiene una alta afinidad por residuos conservados en las proteínas ciclofilinas [64]. Tras formar la unión entre CsA y la ciclofilina, este dímero se unen e inactiva a la fosfatasa calcineurina, evitando la desfosforilación en el factor de transcripción NFAT-1, un importante factor de transcripción necesario para la transcripción de un gran número de citocinas importantes, entre ellas IL-2, y promoviendo la transcripción de otro grupo de citocinas, especialmente del Factor β de Crecimiento Transformante (TGF- β). El TGF- β inhibe la proliferación de linfocitos T, así como la generación de CTLs, generando ambientes anti-inflamatorios [53].

Sin embargo, el uso prolongado de estos inhibidores de calcineurina conlleva a algunos efectos secundarios como; fibrosis renal, surgimiento de neoplasias, entre otras, debido a que el TGF- β tiene acción fibrinógena y además promueve procesos angiogénicos. Estudios comparativos entre CsA y Tac (otro inhibidor de calcineurina), han demostrado que la Tac tiene una eficacia mayor, conservando la integridad en los órganos por tiempos de hasta 3 años [53, 65].

Sirolimus (también conocido como Rapamicina) es otro de los fármacos inmunosupresores de mantenimiento frecuentemente utilizados. Sirolimus tiene efecto al unirse a la prolil-isomerasa FKBP (FK506 binding protein), una proteína

con actividad similar a la ciclofilina, bloqueando de esta manera la producción de IL-2, entre otros factores de crecimiento importantes para muchos linajes celulares del sistema inmunológico. El complejo sirolimus-FKBP se encarga de bloquear la activación de la serin/treonin cinasa S6K1 y, a su vez, es un importante mediador de la cinasa de fosfoinositol trifosfato (PI3K), de esta manera bloquea la expresión del protooncogén bcl-2. Sin embargo, su acción más importante es la de inhibir el complejo I de la vía mTOR (mTORC1), una vía que interviene en gran medida con procesos metabólicos en los linfocitos, como señales para sintetizar factores de crecimiento, nutrientes, regulación de energía y oxígeno para controlar procesos de crecimiento y proliferación celular (biosíntesis de mRNA, síntesis de proteínas, lípidos y nucleótidos, incluso interviene en procesos de autofagia) [66]. Sin embargo, el uso prolongado de este fármaco ha demostrado estar relacionado con surgimiento de neoplasias, así como varios desordenes genéticos debido al bloqueo de la vía mTOR, ya que esta vía también participa en la regulación de la activación de oncogenes como AKT, PI3K o Ras. Además del cáncer, Sirolimus también ha resultado contribuir a enfermedades como Linfangioleiomiomatosis (LAM), complejo de esclerosis tuberosa (TSC por sus siglas en inglés), enfermedades neurológicas, diabetes mellitus tipo II, entre otras [67] [66].

Actualmente, existen otros fármacos de mantenimiento que son actualmente ampliamente usados como; Belatacept (una proteína recombinante resultado de la fusión entre CTLA-4 y la porción FC de una inmunoglobulina humana (CTLA-4Ig), la cual bloquea la vía co-estimuladora de la unión entre CD80-CD86/CD28, necesaria para la correcta activación de linfocitos T, entre otras) [60], o Everolimus (RAD) un derivado del Sirolimus, cuya información se resume en la **tabla 3**.

Fármacos de mantenimiento	Mecanismo de acción
Azatioprina.	Inhibe la biosíntesis de purinas y las señales de CD28.
Glucocorticoides.	Inhibe la formación de NF- κ B y regula a la baja la síntesis de citocinas proinflamatorias.
Ciclosporina.	Se une a ciclofilinas e inhibe la calcineurina, previene la activación de NFAT y la síntesis de IL-2, estimula la síntesis de TGF- β .
Tacrolimus	Se une a las proteínas de unión FK, inhibe la calcineurina, previene la activación de NFAT así como la síntesis de IL-2, estimula la síntesis de TGF- β .
Micofenolato de mofetilo	Inhibe la inosin monofosfato deshidrogenasa y la vía de síntesis de <i>Novo</i> de purinas.
Ácido micofenólico	Inhibe la inosin-monofosfato deshidrogenasa y la vía de síntesis de <i>novo</i> de purinas.
Sirolimus	Se une a proteínas de unión FK e inhibe la vía mTOR por su unión al complejo 1 de mTOR, llevando a un bloqueo de la activación de la proteína cinasa S6, la expresión del proto-oncogén Bcl2.
Belatacept	Proteína de fusión modificada de CTLA-4 humana y una Ig, bloquea las proteínas co-estimuladoras de B7/CD28.

Tabla 3: Fármacos de mantenimiento más comúnmente utilizados en pacientes post trasplantados cada uno con distintos mecanismos de acción (modificado de [53]).

Como se mencionó anteriormente, los fármacos inmunosupresores se enfocan en el bloqueo de las principales vías metabólicas de células pertenecientes al sistema inmunológico, que juegan un importante papel en cada uno de los procesos de rechazo (**Fig. 7**). Sin embargo, todos ellos han demostrado ser efectivos sólo por periodos temporales cortos e incluso, pacientes sometidos a estos tratamientos han desarrollado susceptibilidad a infecciones bacterianas, enfermedades cardiovasculares y surgimiento de neoplasias entre otras [63, 68] (**Tabla 4**). Por ello, grupos de trabajo a nivel mundial, han enfocado sus investigaciones en el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas que no sólo disminuyan el uso de fármacos inmunosupresores, sino que también actúen de manera específica, optando así por el aprovechamiento de las funciones reguladoras de algunos linajes celulares pertenecientes al sistema inmunológico, destacando entre estas, algunos linajes de linfocitos T CD4⁺.

Año de la prueba	Número de pacientes	Enfermedades Cardio Vascular (%)	Infecciones (%)	Cáncer (%)	Otras (%)
1995	3359	38.1	29.7	7.8	24.7
1997	1002	39.9	-	14.1	-
2000	65, 212	42.2	17.2	9.2	31.4
2002	1, 229	30	26.4	18.1	25.5
2007	6, 794	35	27	18	43.4

Tabla 4. Causas de mortalidad en pacientes con trasplante renal sometidos a tratamientos inmunosupresores. Se muestran algunas de las principales causas de mortalidad reportadas en pacientes sometidos a algún tratamiento inmunosupresor durante amplios periodos (modificado de [63]).

2.8. Linfocitos T reguladores (Treg)

El sistema inmunológico en mamíferos ha desarrollado eficaces estrategias para responder a daños, dentro de los cuales, destacan las infecciones por agentes patógenos, así como desarrollo de neoplasias, entre otros. Sin embargo, en conjunto con el desarrollo de este tipo de estrategias, surgió la necesidad de regular estos mecanismos efectoras, con el objetivo de evitar el daño autoinfligido por parte de las mismas respuestas inmunológicas. La respuesta inmune cuenta con diversos mecanismos y linajes celulares reguladores específicos y con capacidad de generar memoria.

De entre el gran número de linajes reguladores con los que cuenta el sistema inmunológico, los linfocitos T reguladores (Treg) destacan por su alta eficacia para conservar la homeostasis en el huésped, regulando desde las respuestas efectoras hasta las posibles respuestas autoinmunes. El papel que desempeñan las células Treg ha sido ampliamente evidenciado ya en ausencia de esta población, se desarrollan enfermedades autoinmunes e inflamación crónica, tanto en humanos como en modelos murinos [69, 70].

Los primeros indicios acerca de la importancia de las Treg, se observaron mediante experimentos en los que a ratones de entre 2 a 4 días de nacidos eran timectomizados y, en los días posteriores, desarrollaban inflamación exacerbada en tejidos, mediada por linfocitos T. Posteriormente, se observó que si a estos ratones se les realizaba una transferencia adoptiva de un “pool” de timocitos o esplenocitos de ratones congénitos adultos, era posible revertir los procesos de inflamación en los tejidos, demostrando la existencia de una población celular derivada del timo encargada de regular estas respuestas inflamatorias [71, 72].

Investigaciones posteriores, demostraron la capacidad de un subtipo de linfocitos T $CD4^+CD45RB^{hi}$ de regular eventos de rechazo en el contexto de trasplante y controlar la inflamación en algunos modelos de autoinmunidad. En estos experimentos, mediante el uso de ratas timectomizadas o ratones con SCID, al ser tratados con transferencia de linfocitos T $CD4^+CD45RB^{hi}$, controlaban significativamente la inflamación en ambos casos [73, 74].

Sin embargo, no fue sino hasta el año de 1995, cuando Sakaguchi y colaboradores, mediante modelos murinos timectomizados y con trasplante de piel, comprobaron que al transferir linfocitos T CD4⁺, que además tenían una alta expresión de la cadena α del receptor para IL-2 (CD25), al tercer día posterior a la cirugía, los ratones controlaban los procesos inflamatorios. A esta población de linfocitos T CD4⁺ capaces de regular procesos de inflamación exacerbados se le denominó linfocitos T reguladores (Treg) [75].

Los linfocitos Treg se caracterizan por tener una alta y estable expresión de CD25 en superficie, además de ser anérgicos. Otra de sus características principales es la expresión del factor de transcripción maestro “forkhead box P3” (FOXP3), no sólo como una marca de identidad, si no que resulta de vital importancia tanto para su diferenciación, como para llevar a cabo su función supresora. La pérdida en la expresión de FOXP3, resulta en la pérdida de toda función supresora en las Treg. Se estima que los linfocitos Treg representan entre el 1-3% del total de linfocitos T CD4⁺ en circulación [36, 76].

Recientes investigaciones mediante análisis epigenéticos han descrito marcas específicas para las células Treg, basadas en patrones de hipometilación en regiones CpG dentro del gen para *Foxp3*, que se encuentran directamente relacionadas con la expresión génica específica de las células Treg [77].

Dependiendo de su origen, las células Treg pueden ser clasificadas en células Treg tímicas (tTreg), aquellas que tienen un origen tímico, anteriormente denominada “naturales” o nTreg; Treg periféricas (pTreg), o Treg inducidas (iTreg) [77].

El desarrollo de las tTreg en timo depende de un gran número de condiciones, dentro de las cuales destacan una alta intensidad de las señales mediadas por el TCR, que depende de la avidéz y duración, de estos 2 aspectos dependen incluso las vías de señalización para el perfil de citocinas que se activarán, lo que será determinante para el desarrollo de una tTreg. La intensidad de la señal del TCR también participa de manera importante en la expresión de FOXP3. Adicionalmente, tras recibir una señal de activación fuerte por el TCR, será necesario la presencia de citocinas que comparten el receptor γ , también conocidas

como citocinas de la cadena y común como: IL-2, IL-7, IL-4, IL-9, IL21 e IL-15. [78, 79].

A diferencia de la tTreg, las pTreg se originan en tejidos periféricos a partir de linfocitos Tn. Para la diferenciación de las pTreg, es necesario contar con señales de activación bajas mediadas por el TCR y señales de co-estimulación subóptimas principalmente en microambientes ricos en TGF- β e IL-2, lo que dará como resultado la inducción de la expresión de FOXP3 y finalmente la diferenciación a pTreg. Finalmente, las iTreg se originan *in vitro* a partir de linfocitos Tn mediante estímulos de activación en presencia de TGF- β e IL-2 principalmente [79, 80].

Los mecanismos de supresión que llevan a cabo las Treg, pueden ser clasificados en; supresión por contacto célula con célula, secreción local de citocinas antiinflamatorias y competencia local por factores de crecimiento (**Fig. 8**).

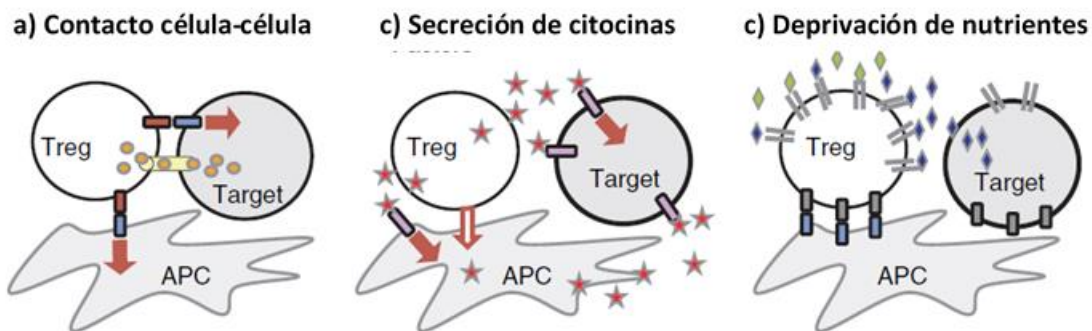


Figura 8: Estrategias de supresión de Treg. Esquema general de las 3 principales estrategias de supresión empleadas por las Treg (modificada de [81]).

La supresión mediante receptores inhibidores como CTLA-4 es una estrategia de supresión de contacto, principalmente utilizada por la tTreg. CTLA-4 se expresa constitutivamente en las Treg, a diferencia de los linfocitos Tn. Para llevar a cabo su función supresora, CTLA-4 debe interactuar con sus ligandos CD80/CD86 que son moléculas expresadas principalmente en APCs, lo que en conjunto con la interacción del TCR con las moléculas de MHC-II, desencadenan señales intracelulares de activación en las células Treg e induce la síntesis y liberación de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO por sus siglas en inglés), la cual se encarga de regular a la baja la expresión de CD80/CD86 en las APCs, catalizar la conversión de triptófano en quinurenina además de otros metabolitos, comprometiendo varias vías metabólicas, así como la síntesis de proteínas y afectando finalmente la proliferación en las células, además estos ambientes tolerogénicos promueven la diferenciación de pTreg [79, 82].

PD-L1 (programmed death 1 ligand), representa otra de las moléculas altamente involucradas en los mecanismos de inhibición por contacto, mientras que PD-L1 y PD-L2 se expresa en las células Treg, su receptor está altamente expresado en la superficie de linfocitos T activados. Al interactuar el ligando con su receptor, se reclutan fosfatasas que antagonizan la actividad de proteínas cinasas asociadas con la señalización del TCR en las células diana, inhibiendo su proliferación [83].

Las modificaciones del microambiente por medio de la secreción de citocinas al medio (microambiente tolerogénico) representa el segundo mecanismo que utilizan los linfocitos Treg para ejercer su función supresora. Una de las citocinas características de las Treg es el TGF- β , de hecho, TGF- β también es requerido para la diferenciación de células Treg así como el mantenimiento en la expresión de FOXP3 [84]. En el contexto de su función reguladora, TGF- β es un potente inhibidor del crecimiento celular que influye en varios tipos de células como epiteliales, endoteliales, hematopoyéticas, inmunes entre otras. TGF- β influye en la regulación de las señales de activación promovidas por el TCR, suprime la producción de IL-2 por parte de los linfocitos T efectoras, evitando la proliferación de estos. En linfocitos T CD8⁺ bloquea la producción de IFN- γ así como la producción de perforina, granzima B y Fas ligando [85, 86]. TGF- β también tiene efecto sobre linfocitos B,

modulando los cambios de isotipo, inhibiendo su proliferación al igual que en otros linajes celulares del sistema inmune innato [85].

LAG-3 es otra molécula que interviene en los procesos de supresión por contacto, esta es una molécula de adhesión asociada a CD4 que se expresa en la membrana celular, ejerce su función al unirse directamente con las moléculas del MHC-II o a los complejos CD3/TCR en linfocitos, promoviendo así señales de regulación negativa en la expresión de CD80 en las APCs. También, promueve señales intracelulares para regular negativamente la expresión de los complejos CD3/TCR inhibiendo así la proliferación de los linfocitos T [87].

La expresión constitutiva de CD25 de las Treg en comparación con el resto de los linfocitos T, les confiere una ventaja para captar y aprovechar la IL-2 en el medio, causando el agotamiento de esta citocina en el medio, necesaria tanto para la activación como para el mantenimiento del resto de los linfocitos, llevándolos a apoptosis por deprivación de nutrientes, esta estrategia ha sido observada tanto *in vivo* como *in vitro* [81].

2.9 Efecto de los fármacos inmunosupresores sobre las células T reguladoras

Como se mencionó anteriormente, el uso de fármacos inmunosupresores ha sido ampliamente utilizado como terapia para pacientes en diversas condiciones clínicas (alergias, enfermedades autoinmunes) pero, sobre todo, han sido muy utilizados en pacientes pre y post trasplantados, con el objetivo de evitar los procesos de rechazo. Anteriormente, se abordaron los efectos generales que tienen algunos de estos fármacos sobre varias de las principales poblaciones efectoras del sistema inmunológico. Sin embargo, en las últimas décadas, se han reportado los efectos en el desarrollo, función, metabolismo e incluso en el destino de su migración tejido-específico, que tienen algunos de estos fármacos (Rapamicina (RPM), Ciclosporin A (CsA), entre otras), sobre poblaciones reguladoras [88].

Uno de los estudios que evidencian algunos de los efectos de estos fármacos sobre las Treg ($CD4^+CD25^{hi}$) es el trabajo realizado por Tingting Wu *et al*, en el cual, mediante un modelo murino, transfirieron linfocitos T $CD4^+$ con un TCR transgénico ($CD4^+KJ1-26^+$) en un ratón singénico Wild type y posteriormente, fueron inmunizados en presencia de diferentes fármacos: micofenolato mofenil, leflunomida, ciclofosfamida, RPM así como Fingolimod (FTY720), este último actúa sobre el receptor de esfingosina-1-fosfato (S1P), el cual induce apoptosis en linfocitos activados y modifica el destino de su migración [68]. Posteriormente evaluaron las poblaciones de linfocitos T efectoras y de linfocitos Treg ($CD4^+CD25^{hi}FOXP3^+$), obteniendo una inducción favorecida hacia esta última población, únicamente en aquellos ratones que fueron tratados con RPM y FTY720, a diferencia de aquellos administrados con el resto de los fármacos antes mencionados, en los cuales, se observó una disminución generalizada de las poblaciones de linfocitos T $CD4^+$. Tras observar estos resultados, concluyeron que cada fármaco actúa de diferente manera sobre las poblaciones de Treg, favoreciendo su generación o abatiéndola junto con el resto de las células efectoras (**Tabla 5**) [88].

El efecto que tiene la RPM sobre las células Treg ha sido estudiado en diversos modelos, siendo uno de los fármacos que ha demostrado no tener importantes efectos negativos sobre esta población. Los primeros estudios realizados *in vitro* en linfocitos T CD4⁺ tras su estimulación alogénica en presencia de RPM, demostraron que la RPM no tiene impacto en la expresión de FOXP3. Estos resultados se mantenían tanto en células humanas como en murinas [89] [88, 90-92].

Otros trabajos han demostrado que la RPM no actúa negativamente en la capacidad supresora de las Treg, de hecho, estudios *in vitro* han demostrado que aquellas Treg cultivadas en presencia de RPM, potencian su capacidad supresora en comparación con aquella cultivadas en ausencia de RPM [93]. e incluso se ha observado una gran resistencia a procesos apoptóticos provocados por la RPM en Treg comparado con los linfocitos T efectores [88, 90-92].

Fármaco	Efecto sobre linfocitos T efectores	Efecto sobre linfocitos Treg
Corticosteroides.	Induce apoptosis, inhibe la producción de citocinas, interfiere con la migración.	Estimula la expresión de FOXP3, preserva su actividad supresora y su supervivencia.
Tracolimus (FK506).	Inhibe la activación de células, induce la muerte por apoptosis e inhibe la proliferación.	Inhibe la expresión de FOXP3, así como su potencial supresor.
Ciclosporina.	Inhibe la activación y la proliferación de los linfocitos T.	Inhibe la expresión de FOXP3, así como su función supresora.
Daclizumab/ Basiliximab.	Inhibe la proliferación mediada por IL-2.	Datos insuficientes
Rapamicina y derivados.	Bloquea la proliferación de linfocitos T.	Preserva tanto su función supresora como su supervivencia.
Micofenolato mofetil (MMF).	Bloquea selectivamente la proliferación en linfocitos.	Preserva tanto su función supresora como su supervivencia.
Anticuerpos de depleción de células T (ATG, OKT-3, Campath).	Lisis dependiente de complemento, induce apoptosis; inhibe la proliferación.	Induce su expansión tanto <i>in vitro</i> como <i>in vivo</i> .

Tabla 5. Fármacos inmunosupresores y sus principales efectos sobre linfocitos T. Comparación de los efectos de algunos fármacos inmunosupresores entre linfocitos T efectores y Treg.

2.10 Treg en la inmunoterapia

Las células Treg han demostrado tener una gran importancia durante las últimas décadas, en el desarrollo de nuevas estrategias en contra de enfermedades autoinmunes (diabetes mellitus tipo I, hepatitis autoinmune) y en el mantenimiento de órganos trasplantados en pacientes [94].

En modelos de trasplante de médula ósea en ratón, se ha observado que al transferir células Treg tras realizar el trasplante, disminuye el riesgo de rechazo durante tiempos considerables debido a la capacidad de las Treg para suprimir las respuestas en contra de injerto [80]. En general, la terapia adoptiva basada en el uso de células Treg ha demostrado resultados importantes para su uso en trasplante de órganos en modelos de ratón.

En humanos, las pruebas clínicas para su uso como terapia, no ha sido tan exploradas, sobre todo en trasplante de órganos sólidos, principalmente por la ausencia de marcadores específicos de superficie expresados en las células Treg, lo que dificulta su identificación y seguimiento.

Se sabe que la expresión de FOXP3 en células Treg de humanos, puede no ser tan estable a diferencia de en el ratón. Por otro lado, se ha observado que células T efectoras ($CD4^+CD25^-$) expresan transitoriamente FOXP3 sin adquirir funciones reguladoras. Otra gran limitación de utilizar a FOXP3 como marcador de Treg es, que al ser endógena su localización, es necesaria la permeabilización de las células Treg para su identificación, lo que compromete por completo su viabilidad [95].

La capacidad de las células Tregs para inducir tolerancia ha sido relacionada con la supervivencia prolongada en aloinjertos. Algunos de estos mecanismos supresores de la respuesta inmune involucran la producción de citocinas anti inflamatorias, supresión directa de células efectoras y modulación de la maduración y función de las DCs [95].

El uso de linfocitos Treg en la terapia contra el rechazo de aloinjertos ha dado excelentes resultados hasta ahora, principalmente atribuido a sus funciones reguladoras, aumentando considerablemente el tiempo de vida media de

aloinjertos, de hecho, algunos grupos a nivel mundial ya han comenzado con pruebas clínicas en pacientes con post trasplantados, mediante diversas estrategias, por ejemplo, Guys's y Thomas, han implementado esta terapia mediante el uso de Treg (CD4⁺CD25⁺) autólogas, aloreactivas, expandidas *in vitro* policlonalmente y posteriormente reinfundidas a partir del quinto día post-trasplante, en dosis establecidas de entre 1-10X10⁶ por kilogramo de peso corporal del paciente. Otras pruebas en progreso son aquellas realizadas en la universidad de California (E.U.A), mediante el uso de células Treg autólogas (CD4⁺CD25⁺CD127⁻), expandidas *in vitro* y posteriormente reinfundidas en el paciente en una sola dosis de 320X10⁶ Treg, 6 meses posterior al trasplante entre muchos otras pruebas clínicas que se resumen en la **Tabla 6** [94] . Aunque se han logrado grandes avances en el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas mediante el uso de células Treg, la falta de marcadores específicos en las células Treg, ha representado un gran problema para su identificación y aislamiento *in vivo* e *in vitro* sin comprometer su viabilidad y asegurando su pureza. Es por esto, que estas investigaciones se han ampliado al uso de diferentes linajes celulares con la capacidad de inducir tolerancia hacia el injerto y además, que cuenten con marcadores de superficie específicos, superando así la problemática que presenta trabajar con Treg [10].

Autores	Pacientes	Estatus	Protocolo	Dosis de Treg	Tiempo de infusión
Guy's y Thomas NHS Fundación Trust Universidad de California	Trasplante Renal	Reclutando	Policlonal, Treg CD4+CD25+	Una dosis de 1-10 X 10 ⁶ /kg	5 días post trasplante renal
Universidad Charite, Berlin, Alemania	Trasplante Renal	Reclutando	Células Treg autólogas alorreactivas	Una dosis de 300 X 10 ⁶ y 900 X 10 ⁶	No especificado
Hospital General de Massachusetts	Trasplante Renal	Reclutando: Sólo con Invitación	Policlonal, Treg CD4+CD25+ autólogas	Una dosis de 0.5 X 10 ⁶ , 1 X 10 ⁶ y 3 X 10 ⁶ células/kg	No especificado
Universidad de Northwestern	Trasplante Renal	En desarrollo	Treg alorreactivas anergizadas con Belatacept	Dosis no especificada	3 días post trasplante renal
Universidad de California	Trasplante Renal	En desarrollo	Policlonal, Treg autólogas CD4+CD25+	Dosis no especificada	2 meses post trasplante
Instituto nacional de Alergia y enfermedades infecciosas	Inflamación subclínica en trasplante renal	En desarrollo	Policlonal, Treg autólogas CD4+CD25+CD127 ⁻	Una dosis de 320 X 10 ⁶	Entre los primeros 6 meses post trasplante

Universidad Nacional de Investigación Médica Pirogov, Rusa	Trasplante Renal	Reclutando	Policlonal y alorreactivas, células Treg	Una Dosis de 400 X 10 ⁶	Entre los primeros 6 meses post trasplante
Guy's y St Thomas NHS Fundación Trust	Trasplante de Hígado	Desconocido	Policlonal, Treg autólogas CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low} FoxP3 ⁺ Treg	Dos dosis de 200 X 10 ⁶	30 días y 6 meses post trasplante
Universidad Medica Nanjing	Trasplante de Hígado	En desarrollo	Policlonal,	Una Dosis de 1 X 10 ⁶ y 4.5 X 10 ⁶ células/kg	12 semanas post trasplante
Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas	Trasplante de Hígado	Reclutando	Policlonal, Treg autólogas CD4 ⁺ CD25 ⁺	Múltiples dosis de 1 X 10 ⁶ células/kg a diferentes intervalos	No especificado
Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas	Trasplante de Hígado	Reclutando	Treg autólogas Alorreactivas	Una dosis de 50 X 10 ⁶ , 200 X 10 ⁶ y 800 X 10 ⁶	No especificado

Tabla 6. Pruebas clínicas mediante el uso de Treg. Resumen de las pruebas clínicas en curso realizadas en institutos, universidades o centros clínicos (Modificado de [94]).

2.11. Células T reguladoras tipo 1 (Tr1)

Los primeros reportes de este linaje celular surgen a partir del trabajo realizado por Rosa Bacchetta y colaboradores, en pacientes con SCID que, tras haber sido trasplantados con médula ósea de un donador, algunos de éstos mostraron resistencia al desarrollo de enfermedad de injerto contra huésped (GvHD por sus siglas en inglés). Al realizar pruebas en estos pacientes, se encontró que presentaban altas concentraciones de IL-10 en sangre, así como un incremento en los números de linfocitos T CD4⁺ alorreactivos. Ellos observaron que al administrar Abs bloqueantes de IL-10, iniciaba el desarrollo de GvHD, por lo que concluyeron que la IL-10 tenía un importante papel para evitar el desarrollo de esta enfermedad. Posteriormente, se dieron a la tarea de identificar las fuentes principales de la IL-10 en estos pacientes, por lo que, a partir de poblaciones celulares presentes en sangre periférica, se identificó mediante Reaccion en Cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) una población de linfocitos T CD4⁺ alorreactivos que presentaban una gran concentración del RNA mensajero (mRNA) para IL-10 así como concentraciones disminuidas del mRNA para IL-2. Además, observaron poblaciones de monocitos que expresaban porcentajes disminuidos de moléculas de HLA clase II debido al efecto de la IL-10, las cuales, al realizar ensayos de MLR *in vitro* con poblaciones de linfocitos T, obtuvieron poblaciones de linfocitos T CD4⁺ con las mismas características de las poblaciones purificadas *in vivo*, dilucidando la importancia de estas poblaciones productoras de IL-10 en los pacientes trasplantados [96] [97].

Posteriormente, Roncarolo y colaboradores, identificaron un subtipo de linfocitos T CD4⁺ capaces de prevenir la colitis a través de una respuesta antígeno-específica; esta población celular difería de las células Treg convencionales al ser independientes de la expresión de FOXP3. La función reguladora de estas células parecía ser ejercida por la producción de altos niveles de IL-10 y bajos de IL-4 e IL-17 a diferencia de los linfocitos Th2 [98] [99]. En un estudio distinto, se aisló una población de linfocitos T proveniente de un paciente con SCID post trasplante, la cual se caracterizaba por la producción de altos niveles de IL-10 e IL-15 y bajos niveles de IL-4 [99]. En 1998 otro estudio demostró que la activación *in vitro* de

células T, tanto de humano como de ratón, en presencia de IL-10 resultaba en la generación de clonas de células T con un perfil de citocinas distinto al reportado para Th1 y Th2 pero similar al de la población aislada de pacientes con SCID, produciendo altos niveles de IL-10, TGF- β e IL-15, pero bajos niveles de IFN- γ e IL-2, y una nula producción de IL-4 [100]. A estas células reguladoras se les denominó T reguladoras tipo 1 (Tr1).

Las células Tr1 suprimen la respuesta de células T y APC, mediante la secreción de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- β [101]. Adicionalmente, secretan granzima B y perforina, estos mecanismos son dirigidos principalmente a APCs de origen mieloide, como las DCs. También cuentan con la capacidad de activar respuestas mediante contactos célula con células, dependientes de CTLA-4 y PD-1 [101].

Hasta hace poco el método de identificación de Tr1 *in vivo*, se basaba en el particular perfil de citocinas que secretaban (IFN- γ^{++} , IL-2^{-/+}, IL-4⁻, IL-5⁺⁺, IL-10⁺⁺⁺, TGF- β^{+++}) [102], lo cual representaba, al igual que en las células Treg, una gran problemática para su obtención y purificación *ex vivo*. Las células Tr1 han sido poco a poco caracterizadas, y todo indica que podrían ser fuertes candidatas para su uso en la terapia contra enfermedades autoinmunes o el rechazo al aloinjerto. No fue hasta el año 2013 que Nicola Gagliani y colaboradores, identificaron la expresión de 2 marcadores específicos en la superficie de linfocitos Tr1, el receptor 3 activador de linfocitos (LAG-3 por sus siglas en inglés) y la integrina CD49-b, facilitando su identificación y purificación *in vivo* e *in vitro* [98] [101].

La identificación de marcadores de superficie específicos en las células Tr1, confiere una enorme ventaja en la identificación, superando el problema que presentan las Treg convencionales, favoreciendo su uso en numerosos estudios y desarrollo de alternativas terapéuticas, basadas en el aprovechamiento de sus funciones.

Hasta hace algunos años el uso terapéutico de células Tr1, ha sido aplicado en pacientes con SCID, neoplasias hematológicas avanzadas [98], así como su uso en modelos murinos para enfermedades como esclerosis múltiple [103], entre otras.

El porcentaje de Tr1 encontrados en sangre periférica *in vivo* es demasiado bajo, es por esto por lo que se ha optado por el desarrollo de protocolos que permitan su diferenciación y expansión *in vitro* a partir de linfocitos Tn. Sin embargo, también se ha visto que dependiendo del protocolo empleado para la diferenciación a Tr1, éste puede repercutir directamente en los resultados tanto del porcentaje obtenido, como de la eficiencia en la funcionalidad de las células Tr1 obtenidas.

En modelo murino, se ha descrito la obtención de células Tr1, mediante su estimulación con mAbs anti-CD3 y anti-CD28, en presencia de vitamina D3, dexametasona y mAbs anti-IFN- γ , anti-IL-4 y anti-IL-12. La neutralización de IL-10 en estos cultivos, daba como resultado la inhibición del desarrollo de células T productoras de IL-10. Una gran cantidad de protocolos se basan en la activación policlonal de linfocitos Tn de humano o de ratón, con mAbs anti-CD3 y anti-CD28, variando en ellos, el estímulo complementario a la activación, como la presencia de IL-27, y vitamina D3 [99].

Aunque existen un gran número de protocolos, como aquellos basados en la diferenciación de células Tn a Tr1 mediante activación policlonal con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de IL-10, o el uso de estímulos de IL-27, vitamina D3, entre otros; uno en particular, basado en el uso de un subtipo de DCs tolerogénicas productoras de IL-10 (DC₁₀), ha sido probado en la generación de Tr1 a partir de muestras de pacientes urémicos en lista de espera para trasplante renal, obteniendo hasta un 11% de células Tr1 alo-específicas, demostrando ser uno de los protocolos más adecuados en materia de trasplante renal [104].

2.12. DC₁₀

Las DC₁₀ son un subtipo de células dendríticas tolerogénicas que se caracterizan principalmente por la producción de grandes cantidades de IL-10 así como por la expresión de marcadores de superficie particulares (CD14+CD16+CD11c+CD11b⁺) y moléculas tolerogénicas entre las cuales destacan HLA-G, ILT2, ILT3 e ILT4 [105].

Esta población ha sido descrita en sangre periférica, así como en órganos linfoides secundarios de individuos sanos, y se ha observado un incremento de esta población en mujeres embarazadas, pacientes con leucemias mieloides aguda, entre otros. La diferenciación de DC₁₀ se ve favorecida principalmente a partir de monocitos o APCs residentes de tejido que se someten a microambientes ricos en GM-CSF e IL-10 [106].

A pesar de su baja capacidad estimuladora, en conjunto con la expresión de moléculas co-inhibitorias (principalmente ILT4 y HLA-G) y su alta producción de IL-10, se les confiere a las DC₁₀, la especial capacidad para promover la diferenciación de células Tr1 a partir de linfocitos T_n, por lo que han sido consideradas como una importante herramienta para su uso en la inmunoterapia [107].

Numerosos protocolos para la diferenciación de Tr1 aloespecíficas han sido reportados sin tener una alta eficacia para conseguir este propósito; por el contrario, gracias a sus características, las DC₁₀ han demostrado mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* llevar a cabo esta tarea con excelentes resultados [107].

2.13. Receptores ILT

Los receptores “Ig-like transcripts” (ILT), pertenecen a la super familia de las inmunoglobulinas (Ig). Este tipo de receptores comparten cierta similitud con los receptores KIR expresados principalmente en las células NK. La expresión de los receptores ILT se ve compartida en varios linajes de leucocitos, especialmente en células de origen monocítico [35].

Estructuralmente, los ILT se describen como proteínas que se conforman por 2 o 4 dominios Ig extracelulares, una región transmembranal y una región intracelular que cuenta con dominios ITIM o ITAM, lo cual les confieren la naturaleza en la función ya sea inhibitoria o activadora de cada subtipo de receptores ILT, respectivamente. Dentro del grupo de receptores ILT con funciones inhibitorias se incluyen los receptores ILT2, ILT3, ILT4 e ILT5. Estos receptores son capaces de prevenir la activación células al unirse con sus ligandos (**Tabla 7**) [108].

Aunque se han descrito varios tipos de receptores ILT con función inhibitoria, no se conoce el ligando de todos. Los receptores ILT2 e ILT4 se encuentran dentro de estas excepciones, ya que se ha comprobado la unión de proteínas quiméricas ILT2 e ILT4 mediante modelos de células transfectadas con diferentes tipos de MHC-I, incluidas las moléculas de histocompatibilidad clase I no clásicas HLA-G [109, 110].

La unión del ILT2 o ILT4 con sus ligandos se traduce en una señal intracelular que disminuye o inhibe los flujos de Ca^{+} intracelular, lo cual resulta un paso importante durante la activación en una amplia variedad de leucocitos. Esta inhibición del flujo de calcio se ve mediada por el reclutamiento de fosfatasas tales como SHP-1 [110]. Por otra parte, también se ha reportado la capacidad de ILT2 e ILT4 para inhibir la producción de algunas citocinas [109].

Receptor	Otro nombre	Dominio intracelular	Ligandos	Patrones de expresión
ILT2	LIR1, CD85, MIR7	4 ITIM	MHC-I	Monocitos, DC, linfocitos B, algunos T y NK.
RefILT3	LIR5, HM18	3 ITIM	¿?	Monocitos, DCs
ILT4	LIR2, MIR10	3 ITIM	MHC-I	Monocitos, DC, linfocitos T.
ILT5	LIR3, HL9	4 ITIM	¿?	Monocitos y DCs

Tabla 7. Receptores ILT. Función inhibitoria, así como sus ligandos y poblaciones en donde se expresan (modificado de [35]).

2.14. HLA-G

HLA-G es una molécula no clásica de MHC clase I que se expresa en distintos tipos celulares, desde células pertenecientes a tejidos fetales como células amnióticas, precursores de eritrocitos y citotrofoblastos, hasta células presentes en órganos inmuno-privilegiados (cornea, timo, islotes pancreáticos etc.) o incluso se ha demostrado la expresión de HLA-G en poblaciones de sangre periférica [111].

La expresión de HLA-G se ve favorecida principalmente en DC y macrófagos. Se ha observado que bajo ciertas condiciones que modifican el microambiente, la expresión basal de HLA-G tanto en DC como en macrófagos incrementa considerablemente, tal es el caso de pacientes diagnosticados con cáncer, esclerosis múltiple, enfermedades inflamatorias, infecciones virales e individuos con trasplante de algún órgano, así como en mujeres embarazadas, donde se ve favorecido un microambiente con citocinas anti-inflamatorias [111, 112].

Esta molécula de histocompatibilidad no clásica juega un importante papel en la tolerancia debido a sus funciones inhibitorias a través de su unión con los receptores ILT2 e ILT4. Su actividad inhibitoria se ve reflejada en la disminución de procesos que se llevan a cabo tras la activación de una extensa gama de leucocitos, tales como diferenciación, proliferación, citólisis, secreción de citocinas proinflamatorias, entre otras [113].

Se ha observado que DCs con una alta expresión de HLA-G, no sólo adquieren funciones tolerogénicas sobre células que juegan un papel en repuestas inflamatorias como los linfocitos T, basadas en la inhibición de la activación y secreción de citocinas pro-inflamatorias, sino que también adquieren la capacidad de inducir su diferenciación en linfocitos células Treg, donde HLA-G juega un papel muy importante [114].

Estas funciones tolerogénicas de HLA-G pueden clasificarse en 2 tipos principales: la inhibición directa mediante el bloqueo en la función de células efectoras y la inhibición indirecta, basada en la generación de células Treg [114, 115].

La capacidad que tiene HLA-G para inducir la diferenciación de Tregs, se observó en experimentos donde linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ que eran estimulados *in vitro* en presencia de HLA-G, no sólo se volvían hipo-respondedores frente la estimulación con antígenos, sino que también adquirirían la capacidad de inhibir la activación y proliferación de otros linfocitos T [114].

2.15. IL-10

2.15.1 Identificación de la IL-10

En el año de 1990, Kevin W. Moore *et al*, describieron que además de la respuesta inmunológica específica que se induce contra del antígeno, es importante una respuesta reguladora que permita recuperar la homeostasis posterior a la infección causada por agentes patógenos. Observaron que la producción de IFN- γ en cultivos *in vitro* de linfocitos Th1 estimulados con lectinas, disminuía en presencia de linfocitos Th2, debido a la producción de una citocina que llamaron Factor inhibidor de la producción de citocinas (CSIF por sus siglas en inglés), la cual posteriormente se conocería como IL-10. Además, observaron el gran potencial regulador que adquirirían linfocitos Tn al ser transfectados con cDNA que codificaba la IL-10 obtenido a partir de linfocitos Th2, dilucidando así la importancia de la IL-10 como citocina anti-inflamatoria [116].

Asociado a estos resultados, poco después, un estudio realizado en pacientes con SCID, tras haberles realizado un trasplante de medula ósea, se observó que algunos de ellos desarrollaron tolerancia hacia el aloinjerto. Al analizar las poblaciones celulares presentes en estos pacientes, se encontraron poblaciones que contaban con una alta concentración del mismo cDNA, anteriormente identificado por codificar la IL-10, a diferencia de aquellos pacientes que por el contrario, presentaban rechazo hacia el aloinjerto [97], definiendo así el posible uso terapéuticos de la IL-10 en el contexto del trasplantes.

2.15.2 IL-10 como citocina antiinflamatoria

Durante algunos eventos como infecciones por organismos patógenos, cáncer o durante procesos de rechazo en pacientes con trasplante de algún órgano, se desatan respuestas de tipo inflamatorio por parte del sistema inmunológico del huésped que, de no ser controladas, podrían llegar a representar un riesgo inminente como daños a tejidos u órganos cercanos a la zona de inflamación [117]. Este tipo de respuestas se ven potenciadas gracias al efecto que tienen las citocinas pro-inflamatorias sobre algunos linajes celulares efectores [118]. Por lo anterior, resulta de vital importancia mantener el control sobre estas respuestas inflamatorias bajo distintas estrategias; es aquí donde las citocinas antiinflamatorias juegan un importante papel como una de las principales estrategias para el mantenimiento de la homeostasis tras respuestas inflamatorias exacerbadas [119].

IL-10 es uno de los más potentes miembros de las citocinas antiinflamatorias que juega un importante papel en la regulación de respuestas inflamatorias exacerbadas. Esta citocina ha demostrado su gran importancia ya que en modelos murinos deficientes de IL-10 demuestran ser más susceptibles al desarrollo de enfermedades intestinales inflamatorias severas así como al surgimiento de enfermedades autoinmunes [120].

IL-10 puede influir en la señalización intracelular de una gran variedad de células del sistema inmunológico como DC, monocitos, macrófagos, linfocitos T, entre otros, promoviendo señales nucleares anti-inflamatorias y, por lo tanto, afectar la función de estos linajes celulares [117].

Tras la unión entre la IL-10 y su receptor específico (IL-10R) se inicia el primer paso para la cascada de señalización. El IL-10R es una proteína tetramérica conformada por dos subunidades α (IL-10 α) y dos subunidades β . Se ha descrito que las subunidades α juegan un importante papel en la unión con la IL-10 mientras que las subunidades β intervienen en el envío de las señales intracelulares mediante su interacción con proteínas adaptadoras, dando como resultado la activación de la proteína cinasa Janus 1 (JAK1 por sus siglas en inglés) y la cinasa de tirosina 2 (TYK2), que a su vez, estas dos cinasas activan a las proteínas STAT3 y STAT1,

las cuales posteriormente se translocan al núcleo para finalmente unirse a los genes responsivos para las STAT, iniciando las respuestas antiinflamatorias [105].

Otra observación importante en estos pacientes con SCID en los que se encontraba una alta concentración de IL-10, fue que en ellos se detectó un linaje de linfocitos T con capacidad reguladora, que tenían como principal característica la alta producción de IL-10 y que a diferencia de las células Treg convencionales, estas nuevas células eran FOXP3 negativas [121].

2.16. Tr1 como terapia celular

Desde su descubrimiento, las Tr1 han demostrado ser una herramienta clave en las actuales terapias celulares propuestas, debido a sus capacidades tolerogénicas. Incluso, actualmente, muchas de estas investigaciones que comenzaron en modelos animales, han logrado ser implementadas en pruebas clínicas en humanos, obteniendo resultados favorables.

Uno de los principales tratamientos propuestos para pacientes que sufren de algún tipo de cáncer hematológico, se basa en el trasplante de médula ósea, sin embargo, en múltiples ocasiones, posterior al trasplante, se presenta GvHD, comprometiendo así la salud del paciente. Sin embargo, se han realizado estudios en los que, mediante la administración de Tr1 aloespecíficas diferenciadas en grandes cantidades *in vitro*, pre- y post trasplante, se promueve la tolerancia hacia éste, evitando el desarrollo de GvHD [121], Otros estudios clínicos han demostrado gran eficiencia para el control de enfermedades autoinmunes como diabetes tipo I y esclerosis múltiple [122, 123],

Recientemente se ha publicado un estudio realizado en pacientes con trasplante renal en el cual, 36 semanas posteriores a la reinfusión de Tr1 aloespecíficas diferenciadas en grandes cantidades con DC₁₀ provenientes del donador (allogénicas), se observó una disminución en los procesos de rechazo, manteniendo así la estructura y función del injerto [124].

Aunque son pocos los trabajos en los que se han implementado estas terapias para pacientes con trasplante renal, sobre todo en países de primer mundo como Estados Unidos, los resultados han sido favorables para el mantenimiento del injerto y, además, sin presentar efectos adversos considerables (**Tabla 8**). Tomando en cuenta lo anterior, resulta de vital importancia implementar estas nuevas estrategias terapéuticas en países con alta demanda de trasplante renal como México, con el objetivo de disminuir el uso de fármacos inmunosupresores mejorando así la esperanza y calidad de vida de estos pacientes.

Autor	Año	Pacientes	Protocolo	Dosis
Bacchetta R. [121]	2006	Trasplante de células madre	MLR de PBMCs totales del donador irradiadas con PBMCs totales del receptor en presencia de IL-10 (10 días de cultivo)	> 5 X 10 ⁶ /Kg
Txcell company (www.txcell.com/about-us/)	2006-2018	Enfermedad de Crohn, Esclerosis múltiple, psoriasis, artritis reumatoide	No especificado	No especificado
Londei y colaboradores [125]	2003	Artritis	Inducción de Tr1 mediante poblaciones de linfocitos B productores de IL-10	No especificado
Atkinson y colaboradores [126]	2003	Lupus, Artritis reumatoide, rechazo de órganos	Inducción ex vivo de Tr1 mediante estímulos con Ab anti-CD3 y CD46 en presencia de IL-2.	No especificado
European vascular genomics network (EVGN) (https://cordis.europa.eu/result/rcn/56034_en.html)	-	Arteriosclerosis	Uso de Tr1 para evitar la formación de ateromas	No especificado
Bacchetta R. [127]	2010	Trasplante de células CD34 ⁺	Diferenciación de Tr1 con DC ₁₀ alogénicas	No especificado

Grazia Locafaro[128]	2017	Pacientes con leucemia	Transferencia del gen para IL-10 por medio de vectores virales	No especificado
Bechara Mfarrej [124]	2017	Trasplante renal	Diferenciación de Tr1 con DC ₁₀ a partir de linfocitos T totales	2-11 X10 ⁶ células/Kg

Tabla 8. Pruebas clínicas mediante el uso de Tr1. Modelos clínicos que han sido implementados en pacientes con diversas patologías en los cuales se ha utilizado como terapia celular a las Tr1.

2.17 Requerimientos para la terapia celular.

La terapia celular, a diferencia de la terapia con fármacos, es más compleja y variable. Además de que muchos mecanismos de acción no han sido dilucidados por completo. Estas únicas características, han llevado a que las regulaciones en el uso de la terapia celular tomen diferentes enfoques en forma de guías especiales para el uso de células como terapia.

La “Guía para el uso de terapias basadas en células humanas” (CBMP por sus siglas en inglés) (<https://www.ema.europa.eu/en/committees/committee-medicinal-products-human-use-chmp>) de la unión europea indica que debido a que estos productos son heterogéneos, se deben tomar en cuenta varios aspectos como el origen y el tipo de célula, así como la complejidad de estas. Algunos de los rubros más importantes en esta guía, son los siguientes:

Criterios generales de riesgo. Origen (autólogo-alogénico), Capacidad para proliferar y/o diferenciarse; capacidad para iniciar una respuesta inmunológica (como blanco o efectora); nivel de manipulación celular (*in vitro*/ expansión *ex vivo*/ activación/ diferenciación/ manipulación genética/ crio preservación); vía de administración (perfusión *ex vivo*, cirugía local o sistémica); duración de exposición o cultivo (corto o permanente) o tiempo de vida media de las células; combinaciones de producto (células o moléculas bioactivas o materiales estructurales), disponibilidad de datos clínicos o experiencia con productos similares [129-131].

Material celular de Donadores. Se han contemplado dentro de las regulaciones las técnicas de purificación de células para su uso en CBMP, cultivos celulares primarios, realizar pocos pasajes de los cultivos celulares antes de ser utilizadas para el CBMP y crear bancos celulares para su almacenamiento y bancos celulares para trabajo [129-131].

Es necesario estipular un sistema controlado de almacenamiento para los bancos celulares que permitan su apropiado mantenimiento, así como su recuperación sin causar ninguna alteración en sus características (fenotípicas o funcionales). Las condiciones de almacenamiento deberán ser optimizadas para asegurar su

viabilidad, densidad, pureza, esterilidad y función. Su identidad deberá ser confirmada mediante evaluaciones genotípicas o de marcadores fenotípicos [129-131].

Células de origen primario. Deberán establecerse y justificarse los procesos y estándares empleados para la apropiada selección y exclusión en los donadores. De ser necesario, mezclar muestras de diferentes donadores, el análisis de riesgo deberá contemplar la posibilidad del incremento en el riesgo de presentar respuestas inmunológicas no deseadas en el receptor, así como de transmisión de enfermedades, comprometiendo la actividad terapéutica. Dependiendo del origen de las células y/o tejidos, otros factores de riesgo deberían ser contemplados (exposición previa a radiación). Tras el uso de células como terapia, es necesario implementar estrategias específicas (con base en el tipo células) para la detección microbiológica en el receptor, mediante ensayos validados capaces de detectar agentes infecciosos, teniendo en cuenta los componentes de medio que podrían interferir con los ensayos (administraciones previas de antibióticos). En el caso de utilizar células provenientes de tejidos no sanos, será necesario definir los criterios de aceptación de acuerdo con su uso previsto [129-131].

Deberán especificarse los parámetros de calidad, teniendo en cuenta aspectos generales como las condiciones de transporte y almacenamiento. En el caso de donaciones autólogas, el régimen de evaluación para el material de inicio deberá ser justificado, tomando en cuenta sus usos autólogos. Durante la obtención y expansión de células primarias para su uso en múltiples pacientes, el lote celular deberá ser apropiadamente caracterizado. El mismo criterio de caracterización deberá ser aplicado para cada lote nuevo [129-131].

Por otro lado, en cuanto a los procesos de manufacturación de CBMP, las guías usualmente no incluyen términos de esterilización, pasos de purificación, eliminación viral y/o pasos de inactivación. Pero se recomienda que los criterios de aceptación para materiales derivados de origen animal o humano sean adecuadamente definidos de acuerdo su uso [129-131].

Estos son algunos de los más destacados rubros de consideración para la implementación de terapia celular en humanos, aquellas terapias que están actualmente implementadas, previamente fueron evaluadas considerando los aspectos anteriores. Particularmente en el caso de terapias para trasplante de órganos basadas en el uso de células Tregs, algunos investigadores, han publicado los rubros que han tomado en consideración para la implementación de sus protocolos en pacientes [132] (**Fig. 9**).

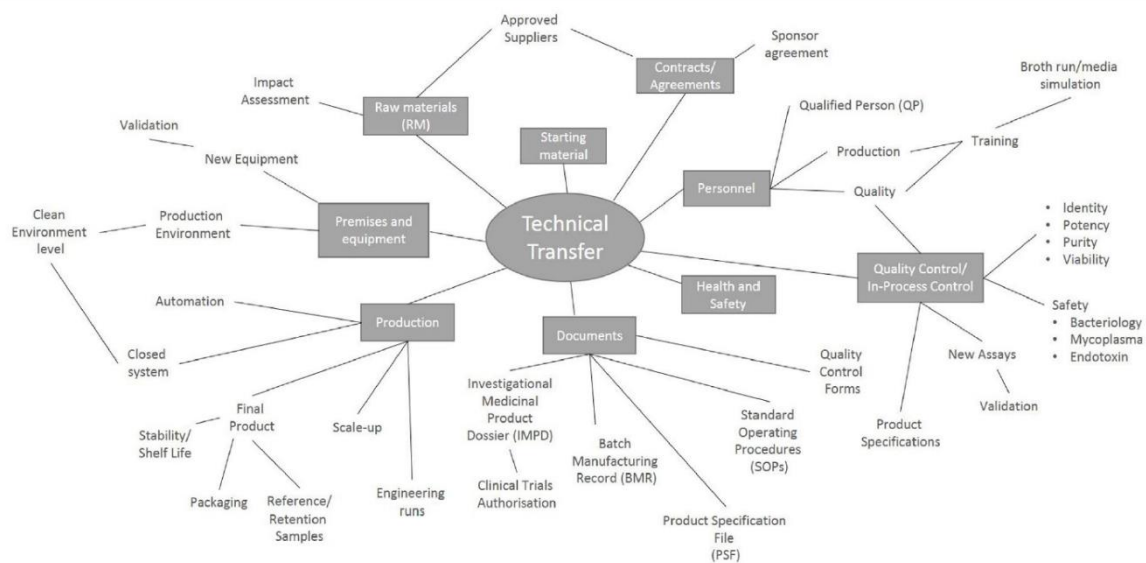


Figura 9. Criterios a considerar para la implementación de terapia celular en pacientes. Rubros principales que se recomienda tomar en cuenta al diseñar, desarrollar, proponer o implementar terapias de células a pacientes [132].

2.18 Protocolo de inducción de Tr1 humanas *in vitro*

Tras su descripción, las Tr1 han sido un linaje celular en el que numerosos grupos alrededor del mundo han enfocado su atención, dilucidando no sólo cuestiones relacionadas con su biología, sino también, desarrollando estrategias para su uso en la inmunoterapia, proponiendo numerosos protocolos para su diferenciación, con el objetivo de cubrir los requerimientos necesarios establecidos en la clínica.

Uno de los primeros protocolos propuestos para la diferenciación *in vitro* de Tr1 aloantígeno específicas fue mediante cocultivos de PBMCs totales con monocitos alogénicos en presencia de rhIL-10 exógena. Posterior a 10 días de cultivo, se obtenían poblaciones de linfocitos T anérgicos productoras de IL-10, sin embargo, dentro del total de la población diferenciada, se obtenían linfocitos T no aloespecíficos, que respondían a antígenos pertenecientes a patógenos o a aloantígenos no relacionados [100]. Esta metodología fue implementada en pruebas clínicas para pacientes con trasplante de células hematopoyéticas, promoviendo tolerancia a largo plazo en estos pacientes.

Recientemente, la compañía francesa TxCell desarrolló un sistema para la diferenciación y expansión de Tr1 antígeno específicas que cumple con los requerimientos para su uso en la clínica. Este protocolo se basa en el uso de APCs artificiales derivadas de *Drosophila* denominadas células "Shneider". Estas APCs son transfetadas con genes que codifican para la expresión en superficie de Abs de ratón anti-CD3, -CD80, -CD58, -IL-2 e -IL-4 humanas. Las células Shneider son cargadas con un antígeno y posteriormente cocultivadas con PBMCs, en presencia de IL-2 e IL-4, con el objetivo de enriquecer los linfocitos T antígeno específicas. Finalmente, las clonas de Tr1 antígeno específicas son seleccionadas por medio de una dilución limitante para posteriormente realizar su expansión. Este protocolo ha sido actualmente usado en la clínica como una terapia para pacientes con enfermedad de Crohn y pacientes con artritis reumatoide, sin embargo, la reproducibilidad de este protocolo resulta imposible debido a que los detalles han sido protegidos por cuestiones legales de patente [100].

El uso de técnicas de ingeniería celular también ha sido utilizado en el desarrollo de los más recientes protocolos para la obtención de Tr1 antígeno específicas. La justificación principal para el desarrollo de este tipo de protocolos se basa en evitar algunos inconvenientes que se han presentado en otros protocolos como: contaminación por poblaciones distintas a las Tr1 durante los cultivos de diferenciación, así como su limitada capacidad de expansión *in vitro*. Este protocolo se basa en la generación de células T CD4⁺ convencionales con una estable expresión del gen que codifica para IL-10 humana (células CD4^{IL-10}), mediante el uso de vectores lentivirales bidireccionales utilizados para la transfección del gen de *il-10* así como un marcador génico de selección (GFP). Las CD4^{IL-10} han demostrado tener características tanto fenotípicas como funcionales similares a los linfocitos Tr1 y, a diferencia de las Tr1, se ha reportado que las CD4^{IL-10} cuentan con una capacidad citotóxica dirigida a líneas celulares leucémicas mieloides (CD13⁺). Gracias a sus características funcionales, el uso de CD4^{IL-10} se ha propuesto como una alternativa terapéutica para pacientes con leucemia trasplantados con células hematopoyéticas, con el objetivo de evitar no sólo el desarrollo de GvHD, sino también para detener el surgimiento de nuevas células tumorales. Aunque este protocolo ha sido desarrollado mediante los estándares requeridos para su uso en la clínica, aún se encuentra en fase de evaluación para poder ser implementado en pacientes [100].

Los protocolos anteriormente mencionados, han sido enfocados para su uso en la inmunoterapia principalmente para pacientes con enfermedades autoinmunes (Enfermedad de Crohn, diabetes tipo I y artritis reumatoide), o GvHD en trasplante de células hematopoyéticas, cada uno con diversas ventajas y desventajas. Sin embargo, a pesar de que podrían tener diversas aplicaciones, ninguno de los anteriores protocolos ha sido enfocados para su uso en el rechazo de órganos sólidos. El desarrollo de un protocolo de diferenciación de Tr1 aloespecíficas mediante el uso de DC₁₀, por el contrario, ha sido enfocado no sólo para pacientes con trasplante de células hematopoyéticas sino también para pacientes con trasplante renal con el objetivo de evitar procesos de rechazo, manteniendo la integridad estructural y funcional del injerto a largo plazo. Este protocolo se basa en

cocultivos alogénicos *in vitro* de DC₁₀ diferenciadas a partir de monocitos provenientes del donador, con linfocitos Tn purificados a partir de PBMCs de sangre periférica del receptor. Este protocolo, ha demostrado ser eficiente en la diferenciación de Tr1 aloespecíficas tanto entre individuos con un alto grado de incompatibilidad génica, como entre individuos compatibles. Por otra parte, el porcentaje en la población de Tr1 obtenidas tras el cocultivo han de alrededor del 15% del total de la población, en comparación del primer protocolo descrito (cocultivos de PBMCs:monocitos), en el que en su mayoría se obtienen poblaciones posiblemente precursoras o distinta a las Tr1. Además, el uso de DC₁₀ permite abordar una terapia enfocada no sólo en los procesos de rechazo mediados por la vía directa de aloreconocimiento, sino también, es posible abordar la vía indirecta mediante la presentación de alopeptidos durante los cocultivos por parte de las DC₁₀. Además, se ha reportado que mediante este protocolo, es posible obtener poblaciones de Tr1 específicas a alopeptidos presentes en las MHC de las DC₁₀ o acoplados en ellas, reduciendo el porcentaje de células con especificidades distintas [100].

Al igual que los anteriores, este protocolo ha presentado algunas desventajas, por ejemplo, el riesgo de obtener contaminación de poblaciones distintas a las Tr1 así como la obtención limitada en los número de Tr1 durante la purificación posterior a su diferenciación [100].

Recientemente, este protocolo ha sido optimizado para su desarrollo con grado clínico y aprobado para su implementación para pacientes en países de primer mundo como Estados Unidos (Identificador clínico del gobierno NCT03198234) entre otros, obteniendo hasta ahora resultados favorables en el mantenimiento del injerto en pacientes trasplantados. Debido a los favorables resultados obtenidos con este protocolo, la información publicada ha ido incrementando, lo que facilita la posibilidad de su implementación y estandarización para su implementación en otros países.

3. JUSTIFICACIÓN

El uso continuo de fármacos inmunosupresores en pacientes con trasplante renal da como resultado una gran susceptibilidad a un amplio tipo de infecciones y neoplasias, entre otras enfermedades, debido al efecto generalizado que ejercen sobre el sistema inmunológico del paciente. Por ello, el desarrollo de nuevas inmunoterapias específicas que reduzcan el uso de los fármacos inmunosupresores ha sido de gran interés. Dentro de las alternativas terapéuticas más prometedoras para evitar el rechazo al aloinjerto, se encuentra la generación *in vitro* de linfocitos Tr1 aloespecíficos, la cual ha resultado efectiva en algunas pruebas clínicas realizadas en países como Estados Unidos, por lo que resulta de gran interés estandarizar estos protocolos para finalmente ser utilizados en cohortes de pacientes mexicanos ofreciendo así una mayor esperanza y mejor calidad de vida.

4. HIPÓTESIS

Es posible generar y expandir *in vitro* células Tr1 aloantígeno específicas a partir de células T “naïve” provenientes de donadores sanos conservando su estabilidad fenotípica y funcional.

5. OBJETIVO GENERAL

Generar y expandir *in vitro* células Tr1 aloespecíficas a partir de linfocitos T “naïve” de sangre periférica de donadores sanos con fenotipo y función estable.

5.1. Objetivos particulares

- Generar *in vitro* DC₁₀ (CD14⁺HLA-G⁺ILT4⁺) a partir de monocitos (CD14⁺) mediante estímulos con rhIL-4, rhGM-CSF e rhIL-10.
- Diferenciar Linfocitos Tr1 (CD4⁺IL-10⁺CD49b⁺LAG-3⁺) aloespecíficos *in vitro*, a partir de linfocitos T “naïve” (CD4⁺CD25⁻CD45RA⁺) mediante cocultivos con DC₁₀ alogénicas y estímulos con rhIL-2 e rhIL-10. .
- Expandir los linfocitos Tr1 aloespecíficos policlonalmente mediante Dynabeads acopladas a Abs anti-CD3 y -CD28 y verificar su estabilidad fenotípica, así como su producción de IL-10 mediante citometría de flujo.
- Evaluar su función supresora aloespecífica *in vitro*, mediante ensayos de supresión.

6. METODOLOGÍA

6.1. Sujetos

Se utilizaron concentrados leucocitarios de individuos sanos colectados aleatoriamente en el banco de sangre perteneciente al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratoria “Ismael Cosío Villegas”.

6.2. Separación de células mononucleares de sangre periférica

A partir de sangre periférica de donadores sanos, se realizó una dilución con PBS 1X (Phosphate Buffered Saline) (1:1). Se estratificó en un gradiente de densidad con Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, UK) (10 mL por cada 40 mL de sangre diluida). Posteriormente, se centrifugó la muestra (2000 rpm/ 30 min/ 10°C). A continuación, se recuperó la fracción celular en la interfase y se realizaron 3 lavados (1500 rpm, 1300 rpm y 1000 rpm/ 5 minutos/ 10°C) con medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, USA) suplementado al 10% con Suero Fetal Bovino (SFB, Gibco, USA, 4 mL). La viabilidad celular se determinó mediante la técnica de exclusión por azul de tripano (Gibco, USA), incluyendo sólo muestras celulares con una viabilidad mayor al 90%.

6.3. Criopreservación de PBMCs.

Las PBMCs obtenidas tras la separación por gradiente de densidad se criopreservaron para ensayos posteriores. Las PBMCs se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado al 10% de SFB (1 mL por cada 20×10^6 células). Se preparó 1 mL por cada 20×10^6 PBMCs de una dilución de SFB (80%) y Dimetil Sulfóxido (Sigma-Aldrich, USA) 20%. Finalmente, se adicionó la solución (SFB/DMSO) a la suspensión celular, se resuspendió y se colocó en crio-viales (20×10^6 células por cada 2 mL), para finalmente conservar los crio-viales a -70 °C.

6.4. Purificación de monocitos (CD14⁺) por selección positiva

A partir de PBMCs se purificaron monocitos (CD14⁺) mediante perlas magnéticas acopladas a Anticuerpos monoclonales (mAb por sus siglas en inglés) anti-CD14 por selección positiva (Miltenyi Biotec). Se resuspendieron 20×10^6 PBMCs en Buffer MACs (30 μ L) y se adicionó el Kit de purificación (Miltenyi Biotec, USA) (10 μ L por cada 10×10^6 PBMCs), se resuspendió y se incubó 20 min/ 4°C/ oscuridad.

Se realizaron 2 lavados (1200rpm/10°C/5 minutos) con Buffer MACs (1 mL a 4°C) para eliminar el excedente de la solución del Kit de purificación. Se decantó la suspensión celular y se resuspendió en Buffer MACs (1 mL a 4°C).

Se recuperó la suspensión celular y se colocó en una columna de separación LS (Miltenyi Biotec, USA) montada en el sistema de campo magnético, posteriormente se realizaron 3 lavados a la columna con Buffer MACs (500 μ L a 4°C) y se retiró la columna del magneto para recuperar las células obtenidas por selección positiva en la columna de separación **(Fig.10)**.

6.5. Diferenciación de DC₁₀ (CD11c⁺CD14⁺HLA-G⁺ILT4⁺).

Monocitos (CD14⁺) fueron resuspendidos en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado al 10% Suero Humano AB (SH) (GEMINI BIO-PRODUCTS)(1 mL por cada 1.5×10^6 monocitos). Las células se sembraron en placas de cultivo de 48 pozos fondo plano (Costar, USA) a una densidad celular de 1.5×10^6 monocitos por pozo en un volumen final de 2 mL de medio de cultivo. Los cultivos fueron estimulados con las siguiente citocinas; rIL-4h (Preprotech, USA) (50 ng/ μ L), GM-CSF (Preprotech, USA) (50 ng/ μ L) e IL-10 (Preprotech, USA) (10 ng/ μ L) y se incubaron durante 8 días (37 °C/ 5% CO₂) realizando re-estímulos los días 3 y 5 con rIL-4h (50 U/mL), GM-CSF (50 U/mL) e IL-10 (10 ng/mL). Finalmente se evaluó el fenotipo celular por citometría de flujo **(Fig.10)**.

6.6. Fenotipo de DC₁₀ por citometría de flujo

Se resuspendieron las DC₁₀ en buffer PBS 1X (20 µL) y se incubaron 20 minutos a 4°C en oscuridad con mAbs anti-CD11c-APC (eBioscience, USA), anti-CD14-FITC (Tonbo, USA), anti-HLA-G-PECy7 (Biolegend, USA), anti-ILT4-PerCP e Fluor 710 (eBioscience, USA). Para eliminar el exceso de mAbs, se realizó un lavado con PBS 1X (100 µL/ 3000 rpm/ 1 minutos/ 10°C) y se eliminó el sobrenadante. Se adicionó paraformaldehído al 4% en PBS IX (PFD) (100 µL) y se incubó 5 min/ 4°C/ oscuridad. Pasado el tiempo de incubación, se realizó un lavado (3000 rpm/ 1 min/ 10°C) y se eliminó el sobrenadante. Finalmente, se resuspendieron las células en FACS BUFFER (200 µL).

6.7. Tinción con CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester)

Se resuspendieron linfocitos T en buffer PBS 1X a 37°C (1 mL), se adiciono CFSE (Thermo Fisher Scientific, USA) en una dilución 1:1000 y se incubaron 15 minutos a 37°C en agitación. Se adicionó medio de cultivo RPMI 1640 suplementado al 10% con SFB (3 mL) para detener la reacción y se realizó un lavado (1200 rpm/ 5 min). Las células se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado al 10% con SFB (1 mL) y se incubaron 20 minutos en oscuridad/ a 37°C. Finalmente, se realizó un lavado (5 minutos a 1200 rpm) y se decantó el sobrenadante. Se utilizó la misma metodología para la tinción con CellTrace Violet (CTV).

6.8 Diferenciación de Tr1

Linfocitos T_n (CD4⁺CD45RA⁺CD25⁻) purificados mediante “sorting” (FACS ARIA, BD), fueron teñidos con CFSE y co-cultivados con DC₁₀ alogénicas en una proporción de 1:10 (DC₁₀:T_n) en placas para cultivos en suspensión fondo “U” (Corning) en medio de cultivo OpTmizer™ CTS™ T-Cell Expansión (Gibco, USA) y se estimularon con rhIL-10 (Preprotech, USA) (10 ng/mL). Los cultivos se incubaron durante 14 días (37°C/ 5% CO₂) reestimulando al día 7 con rhIL-2 (Preprotech, USA, 20 U/mL) e IL-10 (Preprotech, USA, 10 ng/mL). Finalmente se verificó su fenotipo (CD4⁺LAG-3⁺CD49b) mediante citometría de flujo (Attune NxT, Life Technologies) **(Fig.10)**.

6.9. Purificación de Tr1 (CD4⁺IL-10⁺CD49b⁺LAG-3⁺)

Se estimularon los cultivos de Tr1 con el superantígeno Enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB, Sigma) y se incubaron durante 12 horas. Se realizó el ensayo de captura de IL-10 secretada (Miltenyi Biotec, USA) de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Las células fueron incubadas 30 minutos con los mAb anti-CD4-PECy7 (BioLegend, USA), anti-CD49b-APC (BioLegend, USA), anti-LAG-3-PerCpCy5.5 (BioLegend, USA) y el marcador de viabilidad Zombie Nir (BioLegend, USA). Finalmente, las células se resuspendieron en PBS para purificar los linfocitos Tr1 (CD4⁺CD49b⁺LAG3⁺IL-10⁺) por “sorting” (FACS ARIA, BD) **(Fig.10)**.

6.10. Expansión de Tr1

Los linfocitos Tr1 purificados se cultivaron en medio de cultivo OpTmizer™ CTS™ T-Cell Expansion y se colocaron en una placa para cultivos en suspensión de 96 pozos fondo “U” en un volumen total de 200 µL por pozo. Se estimularon las células con rhIL-2 e IL-10 (10 ng/mL), se activaron mediante perlas acopladas a anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (Dynabeads) (Miltenyi Biotec, USA) y se incubaron por 4 días a 37°C/ 5% CO₂. Se recuperaron los cultivos y se retiraron los estímulos de activación, posteriormente se resuspendieron en medio de cultivo OpTmizer™ CTS™ T-Cell Expansion, las células se colocaron en una placa para cultivos en suspensión de 96 pozos fondo “U” en un volumen total de 200 µL por pozo y se volvieron a incubar por 3 días a 37°C/ 5% CO₂. Finalmente, se calculó el número de células obtenidas y se corroboró el fenotipo por citometría de flujo (Attune NxT, Life Technologies) **(Fig.10)**.

6.11. Ensayo de supresión

Linfocitos T (CD3⁺) (células respondedoras) marcadas con CFSE y linfocitos Tr1 (CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺) marcados con CTV fueron co-cultivados (1:2) con DC alogénicas o con DynaBeads anti-CD3/-CD28 en placas de cultivo de 96 pozos fondo "U" en medio OpTmizer™ CTS™ T-Cell Expansion, suplementado al 10% con Suero Humano AB y se incubaron los cultivos durante 4 días (37°C/5% CO₂). Se recuperaron los cultivos y se marcaron con mAbs anti-CD4-APC (Biolegend) y anti-CD8-PE Cy7 (Biolegend) y posteriormente las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo Attune NxT (**Fig.10**). Los valores de supresión se calcularon por medio del índice de división (<http://docs.flowjo.com/vx/experiment-based-platforms/proliferation/>).

6.12. Análisis estadístico

Se graficarón los incrementos relativos de las poblaciones celulares con respecto a su control, calculados a partir de porcentajes de expresión, así como Intensidad media de fluorescencia (IMF) con valores de error estándar. Para los experimentos de diferenciación de DC₁₀ y de diferenciación de Tr1, se realizó una prueba *t* de Student pareada. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas cuyos valores de *P* estuvieran debajo de 0.05. En los gráficos los asteriscos representan los siguientes valores: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. Los análisis fueron realizados en el programa GraphPad Prism 6.

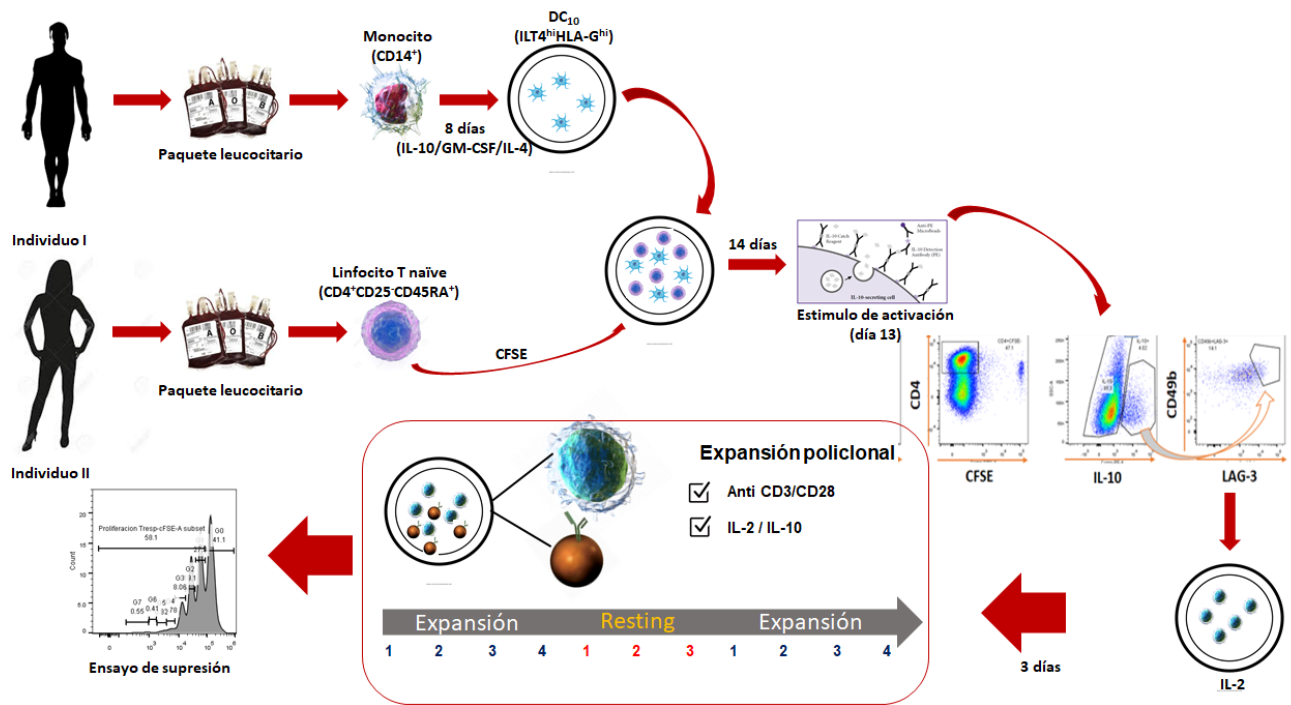


Figura 10: Esquema general metodológico. Resumen de la metodología de la estrategia experimental implementada.

7. RESULTADOS

7.1. Diferenciación de DC₁₀

El uso de DC₁₀ en pruebas clínicas para la diferenciación de Tr1 aloespecíficas ha demostrado no sólo tener una gran eficiencia, sino también cumplir con los requerimientos necesarios para ser usadas en ensayos clínicos; por ello, uno de nuestros primeros objetivos consistía en estandarizar un protocolo para la diferenciación de DC₁₀ *in vitro*.

Para lograr este objetivo, se obtuvieron monocitos CD14⁺ a partir de PBMCs de donadores sanos y se cultivaron *in vitro* durante 8 días, adicionando estímulos con GM-CSF, IL-4 e IL-10 (**Fig. 11-a**). A la par, se diferenciaron DCs convencionales únicamente adicionando estímulos con GM-CSF e IL-4 como controles de comparación fenotípica.

Al término del tiempo de diferenciación se evaluó por citometría de flujo la expresión de las moléculas en superficie HLA-G, ILT4 y CD14. También se evaluó la expresión CD11c como marcador de DCs (**Fig. 11-b**). Una de las principales diferencias fenotípicas obtenidas entre DCs y DC₁₀, es la expresión de CD14, la cual se conserva en las DC₁₀ y disminuye considerablemente en las DC convencionales (**Fig. 11-c**). Además, se puede observar un aumento en la expresión tanto de HLA-G como de ILT4 (90.8%) (**Fig. 11-d**), lo que demuestra una efectiva diferenciación de DC₁₀. En conjunto, bajo nuestras condiciones de diferenciación, el incremento en la expresión de los marcadores reportados para DC₁₀ (CD14, HLA-G e ILT4) resultaron estadísticamente significativos en comparación de nuestros controles de diferenciación (DCs) (**Fig. 11-c, e**) comprobando así la eficiencia en nuestro protocolo de diferenciación *in vitro* de DC₁₀.

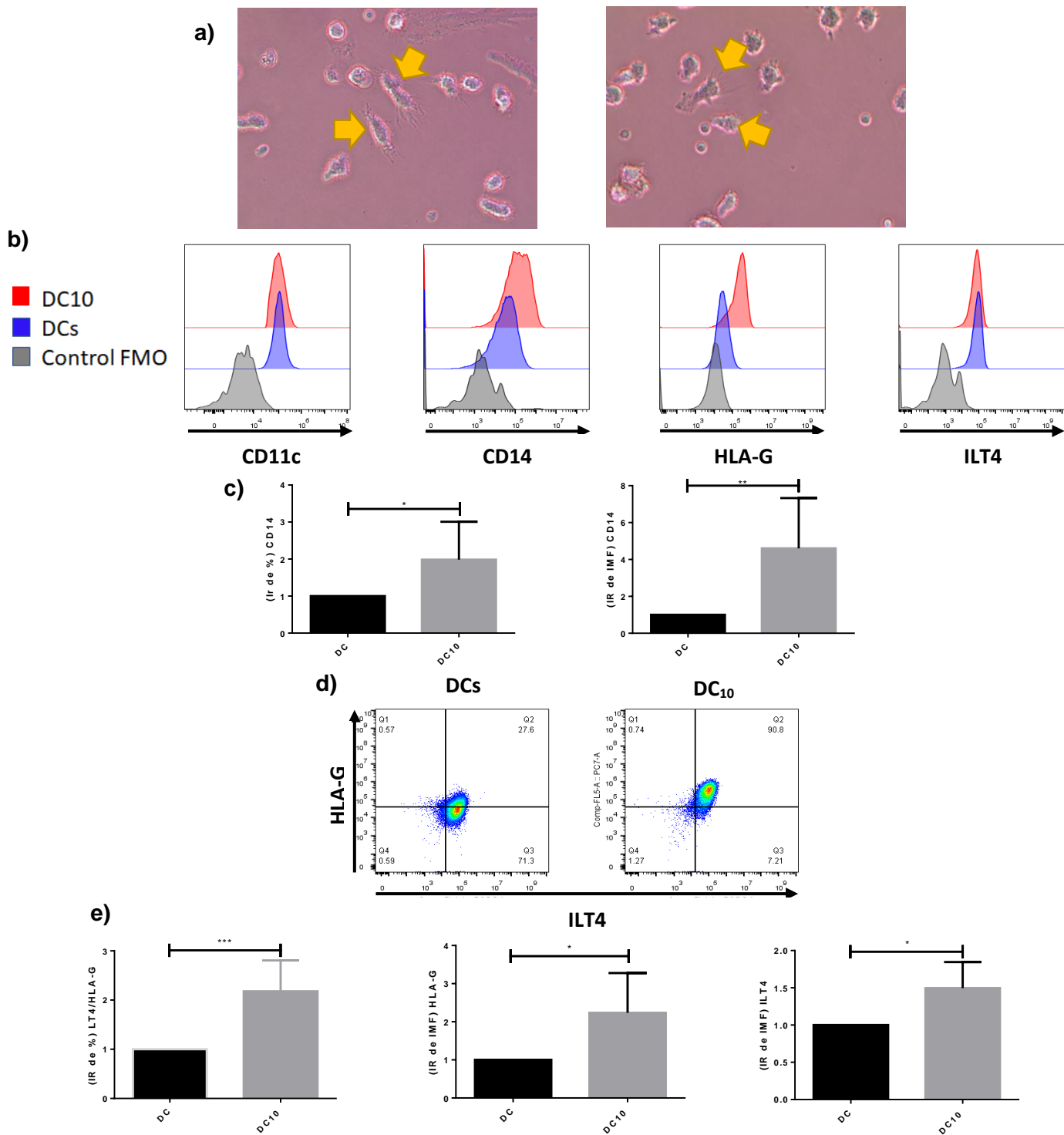


Figura 11. Fenotipo de DC₁₀. a) Imagen de microscopía de DC₁₀ tras 8 días de diferenciación. B) Imagen representativa para la expresión CD11c/CD14/HLA-G/ILT4 entre DCs y DC₁₀. c) Análisis estadístico con respecto a la expresión de CD14 (n=6) (incremento relativo de porcentaje de expresión e IMF). d) Gráfica de puntos representativo de la diferencia entre el porcentaje de células dobles positivas para HLA-G e ILT4 entre DCs y DC₁₀. e) Análisis estadístico con respecto al incremento relativo del porcentaje de la expresión en conjunto de ILT4/HLA-G (n=8) ± SEM, así como incremento relativo de IMF con respecto a ILT4 y HLA-G entre DCs y DC₁₀ (n=5) ± SEM. Análisis estadístico t de Student * p≤0.05. ** p≤0.01.

7.2. Diferenciación *in vitro* de Tr1 aloespecíficas

Al obtener DC₁₀ con una alta expresión, principalmente, de HLA-G e ILT4, era necesario comprobar la eficiencia de nuestro sistema para la diferenciación de Tr1. Basándonos en distintos protocolos previamente descritos por otros grupos de trabajo [104, 107], comenzamos con la estandarización de las condiciones óptimas para la diferenciación de Tr1 aloespecíficas a partir de linfocitos Tn.

Como control para la diferenciación de Tr1, se realizaron co-cultivos entre DCs y linfocitos Tn dónde de acuerdo con lo esperado, no se obtuvieron Tr1 (CD49B⁺LAG-3⁺) (**Fig. 12**). Con el objetivo de mantener un microambiente lo más controlado posible, comenzamos probando un protocolo en el que se usaron DC₁₀ irradiadas (IDC₁₀) co-cultivadas con linfocitos Tn alogénicos en 2 diferentes proporciones de IDC₁₀:Tn (1:5/ 1:10), adicionando rIL-10 exógena (10 ng/mL) y llevando la incubación a 10 días.

Al día 10, se recuperaron los co-cultivos y se evaluó el porcentaje de linfocitos Tr1 (CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺) obtenidos. Usando estas condiciones, se obtuvo una viabilidad de entre el 40 y el 50% de un total de 4 muestras y un máximo del 12% de linfocitos dobles positivos para CD49b y LAG-3 en los co-cultivos con la proporción 1:5 (**Fig. 13-a**), mientras que para los co-cultivos realizados con una proporción de 1:10, se observó una viabilidad mayor al 40%, y con un porcentaje de diferenciación máximo de 15% (**Fig. 13-b**).

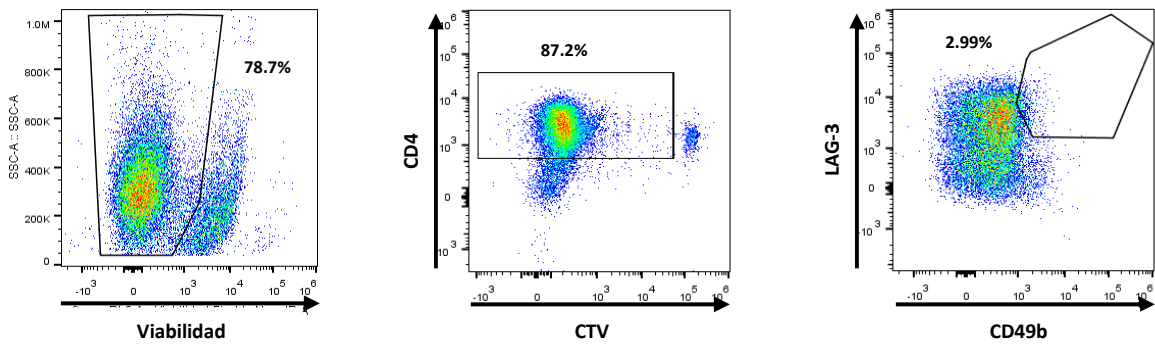


Figura 12. Control de diferenciación. Imagen representativa del control de diferenciación de Tr1 (CD49b⁺LAG-3⁺) realizado mediante co-cultivos con DC convencionales y linfocitos Tn.

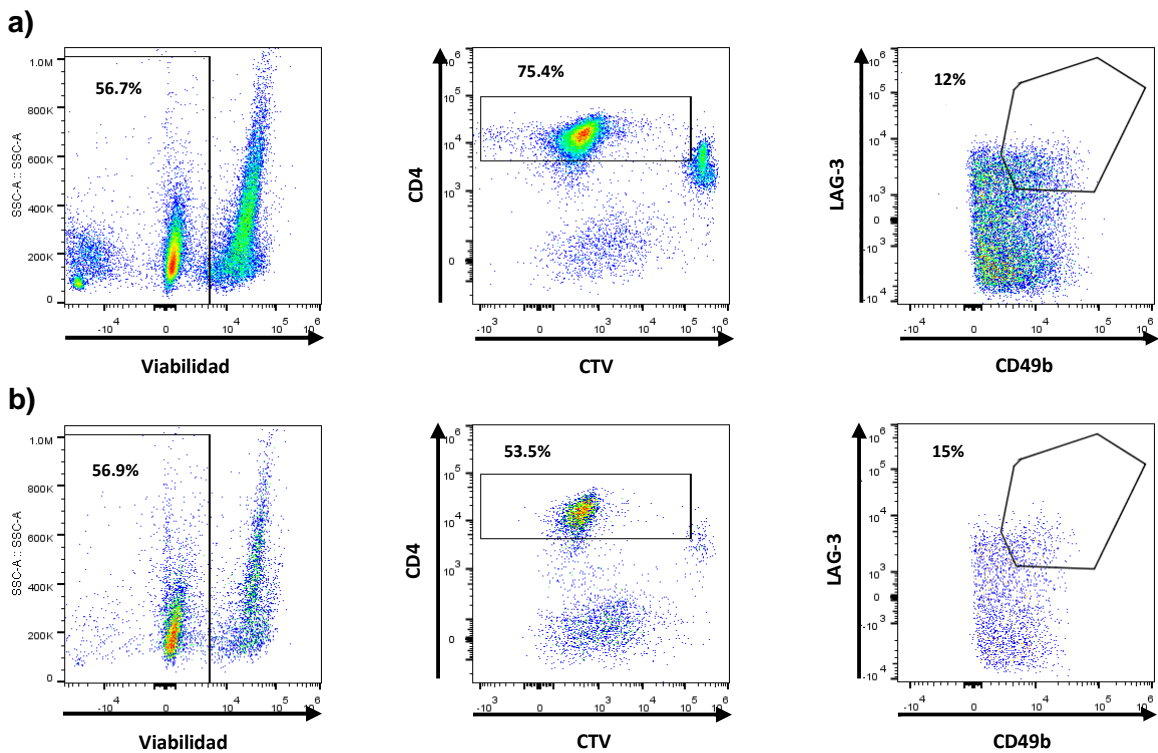


Figura 13. Diferenciación de Tr1 con IDC₁₀. a) Gráficas de puntos representativas de co-cultivos de diferenciación de Tr1 con una proporción subóptima de IDC₁₀:Tn de 1:5. b) Gráfica de puntos de cultivos de diferenciación de Tr1 con una proporción subóptima de IDC₁₀:Tn 1:10. A la izquierda, Gráfica de puntos representativas de viabilidad, en medio células T CD4 proliferantes y a la derecha Gráficas de puntos representativas de células T CD49b⁺ LAG3⁺. Se muestra un experimento representativo (n=4).

Posteriormente, se probaron otras condiciones para tratar de mejorar el porcentaje obtenido de Tr1. Se ha reportado que las DC₁₀ sin irradiar, son altamente eficientes para proporcionar por sí solas las condiciones necesarias para lograr la diferenciación de Tr1 [105, 107, 133, 134]. Por ello, se realizaron co-cultivos de DC₁₀ sin irradiar con linfocitos Tn alogénicos en dos proporciones subóptimas (1:5 y 1:10 respectivamente). De acuerdo con metodologías previamente reportadas, los co-cultivos se mantuvieron durante 14 días, realizando un estímulo con IL-2 al día 7. Al término de la diferenciación, los co-cultivos fueron recuperados para evaluar el porcentaje de diferenciación de Tr1 obtenidos bajo estas nuevas condiciones (**Fig. 14**).

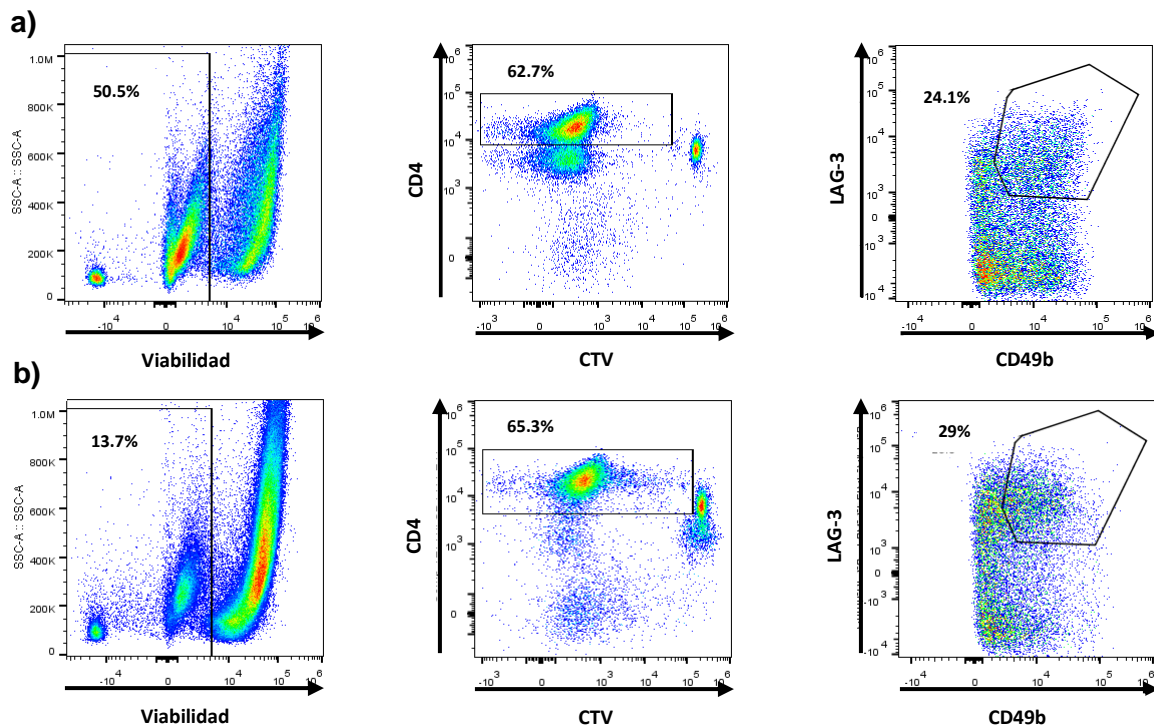


Figura 14. Diferenciación de Tr1 con DC₁₀ a) Cultivos de diferenciación de Tr1 con una proporción subóptima de IDC₁₀:Tn de 1:5. b) Cultivos de diferenciación de Tr1 con una proporción subóptima de IDC₁₀:Tn 1:10. En los dotplots de la izquierda se muestran las células viables, en el centro las células CD4⁺ proliferantes y a la derecha las células doble positivas CD49b y LAG3. Se muestra un experimento representativo de n=4.

Bajo estas condiciones, los porcentajes de viabilidad obtenidos fueron mayores al 13% (1:5 y 1:10), y los porcentajes obtenidos de células CD49b⁺LAG-3⁺ aumentaron considerablemente (2.5 veces) en comparación con los co-cultivos de diferenciación usando IDC₁₀, con un máximo de 24.1% en la condición, con una proporción de 1:5 (**Fig. 14-a**) y un 29% en la proporción de 1:10 (**Fig. 14-b**). Además, se observaron poblaciones dobles positivas mucho más definidas, lo que podría facilitar la purificación de las Tr1 diferenciadas.

Mediante el uso de DC₁₀ sin irradiar aumentaron considerablemente los porcentajes obtenidos de células CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺, sin embargo, probamos una tercera condición para tratar de mejorar estos porcentajes; para ello, se realizaron co-cultivos de DC₁₀ sin irradiar y células Tn alogénicas en las 2 proporciones anteriormente usadas (1:5 y 1:10) pero a diferencia de la condición anterior, se adiciono rhIL-10 (10 ng/mL), desde el comienzo de los co-cultivos, y se incubaron durante 14 días añadiendo un estímulo de rhIL-2 (20 U/mL) y reestimulando con rhIL-10 (10 ng/mL) al día 7. Bajo esta nueva condición, los porcentajes de células CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺ superaron los porcentajes obtenidos con la primera y la segunda condición, optimizando los porcentajes hasta un máximo de 39.4% y un 48.6% para cada proporción en los co-cultivos (1:5 y 1:10 respectivamente), aunque la viabilidad se vio comprometida, obteniendo valores de entre 14%-25% en ambas condiciones (**Fig. 15**).

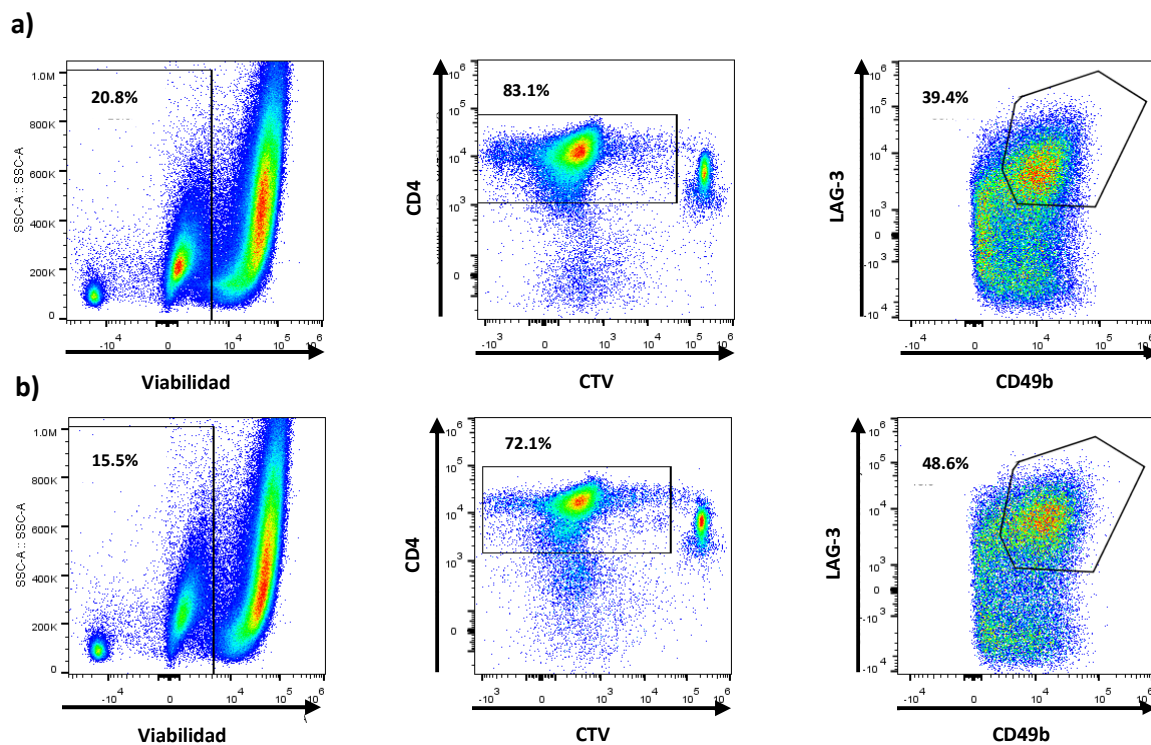


Figura 15. Diferenciación de Tr1 con DC₁₀. a) Cultivos de diferenciación de Tr1 con una proporción subóptima de IDC₁₀:Tn (1:5). b) Cultivos de diferenciación de Tr1 con una proporción subóptima de IDC₁₀:Tn (1:10). En los Gráficas de puntos de izquierda a derecha se muestran los porcentajes de viabilidad, seguido de las células proliferantes tras la diferenciación y finalmente los porcentajes de células diferenciadas (CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺). Se muestra un experimento representativo de n=4.

Se realizaron 4 experimentos independientes por cada condición y a su vez, 4 por cada proporción. Al analizar el conjunto de los datos obtenidos, pudimos observar que aunque la viabilidad de los co-cultivos con DC₁₀ sin irradiar y sin irradiar más rhIL-10 se ve comprometida significativamente durante la diferenciación (**Fig. 16-a**), al comparar cada una de las condiciones con nuestro control de diferenciación, no observamos diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de diferenciación para Tr1 (CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺) entre nuestra primera condición de diferenciación (IDC₁₀: Tn) y el control. Por el contrario, en las condiciones de diferenciación de los co-cultivos con DC₁₀ sin irradiar y sin irradiar más rhIL-10, se observaron diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de diferenciación para Tr1 (CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺) al compararlas con el control (**Fig. 16-b**). Los porcentajes de diferenciación obtenidos en la comparación entre las

proporciones 1:5 y 1:10 de los cultivos con DC₁₀ y los cultivos con DC₁₀ más rhIL-10, no resultaron estadísticamente significativos ($p=0.7$ y $p=0.2$ respectivamente) (**Fig. 16-b**). De manera interesante, se observó una población más definida en la condición de cultivos con DC₁₀ más rhIL-10, tanto en 1:10 como en 1:5, que fue estadísticamente significativa en comparación con los controles de con DC convencionales, especialmente en la proporción 1:10 (**Fig. 15-b y 16-b**), por lo que se decidió elegir esta condición como la óptima para los siguientes experimentos.

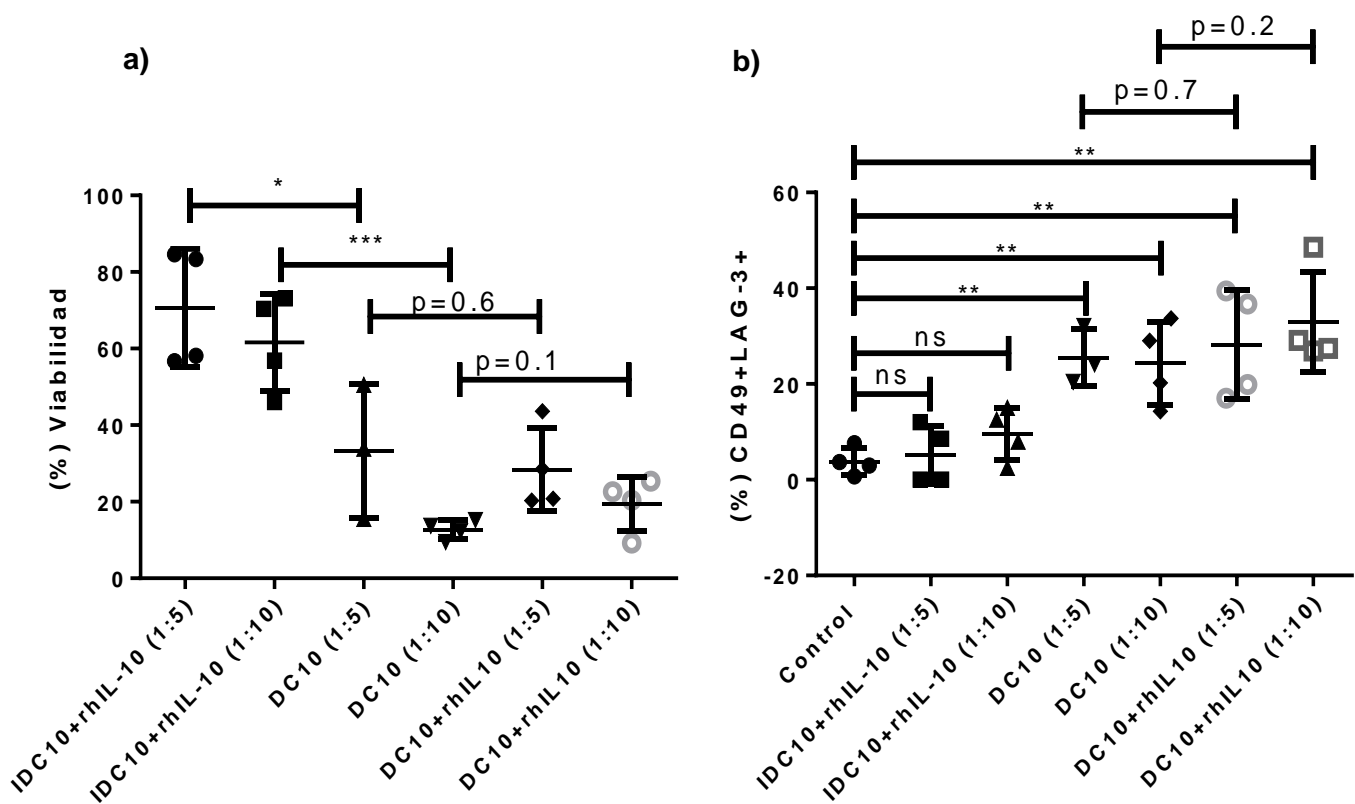


Figura 16. Viabilidad y diferenciación de Tr1 (CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺). a) Conjunto de porcentajes de viabilidad obtenidos en los cultivos de diferenciación de Tr1 ($n=4$) en 2 proporciones diferentes por cada condición (1:5-1:10). b) Porcentajes de células CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺ obtenidas por cada condición en 2 proporciones distintas de DC₁₀:Tn (1:5-1:10) + SEM. Análisis estadístico t de Student * $p \leq 0.05$. ** $p \leq 0.01$. *** $p \leq 0.001$.

7.3 Cinética de diferenciación de Tr1 aloespecíficas

Con los experimentos anteriores fue posible encontrar una condición de diferenciación óptima, con la cual se obtuvieron altos porcentajes de células CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺, sin embargo, al concluir los 14 días de diferenciación, los porcentajes de viabilidad disminuyeron significativamente (**Fig. 16-a**). Con el objetivo de mejorar los porcentajes de viabilidad, conservando los altos porcentajes de diferenciación, realizamos una cinética de diferenciación en la que evaluamos los porcentajes de diferenciación y viabilidad durante los días 9, 11 y 14 de diferenciación.

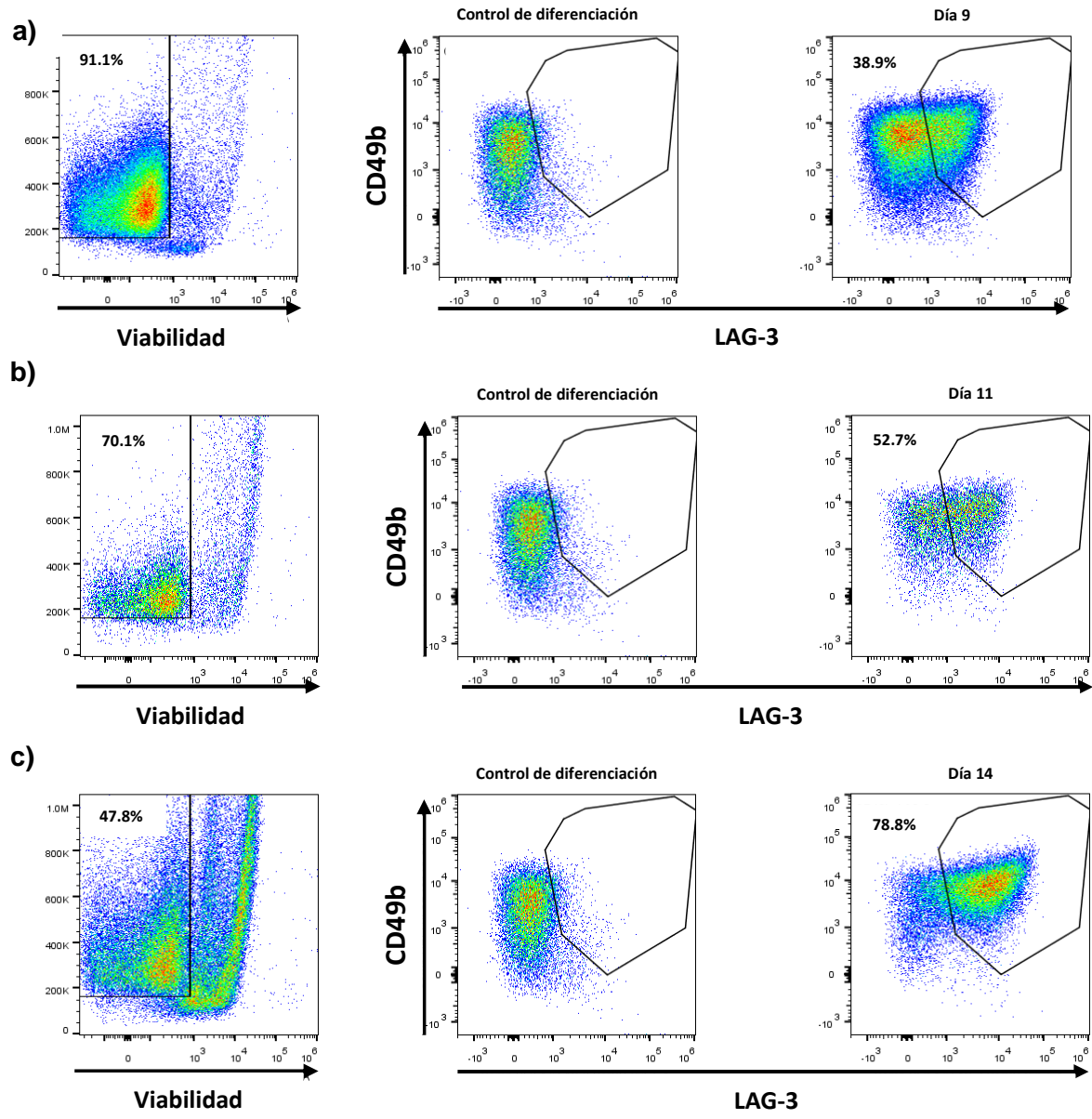


Figura 17. Cinética de diferenciación. a) Día 9, b) día 11, y c) día 14 de diferenciación. En las Gráficas de puntos de la derecha se muestra la viabilidad, en el centro se muestran las células CD4⁺CD49b⁺LAG3⁺ de los cultivos sin condiciones de diferenciación Tr1 y a la derecha los Gráficas de puntos de las células dobles positivas bajo las condiciones estandarizadas de diferenciación para células Tr1.

En el día 9 de diferenciación, se evaluaron los porcentajes de viabilidad y diferenciación iniciales en la cinética, para ello, se recuperó una parte de los cultivos y se analizó, obteniendo un 91.1% y un 38.9%, respectivamente. Sin embargo, a este tiempo no se observa una población de células CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺ bien delimitada, lo que podría comprometer la pureza de la muestra durante la purificación de esta población (**Fig. 17-a**).

Continuando con la cinética de diferenciación, se recuperó otra fracción de los cultivos de diferenciación correspondiente al día 11, y se evaluaron los porcentajes de viabilidad y diferenciación. Tal como se esperaba, al incrementar los días de cultivo, la viabilidad se ve comprometida, disminuyendo de un 91.1% hasta un 70.1% (**Fig. 17-b**), en cambio, la población de células CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺ no sólo incrementó en porcentaje (de 38.9% a 52.7%), sino que también se observa más delimitada y homogénea (**Fig. 17-b**).

Finalmente, evaluamos los cultivos en el día 14 de diferenciación. Aunque los porcentajes de viabilidad disminuyeron aún más (de 70.1% hasta 47.8%), los porcentajes de células CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺ alcanzaron su valor máximo llegando hasta un 78.8%; además, se obtuvo una población bien definida, lo cual es necesario para facilitar su purificación, asegurando un alto nivel de pureza en la población (**Fig. 17-c**). A partir de estas observaciones, concluimos que a pesar de que la viabilidad fuera considerablemente menor durante el transcurso de los días de diferenciación (**Fig. 18-a**), era importante continuar los cultivos hasta el día 14 de diferenciación, para obtener una población viable, bien definida y casi en su totalidad de células CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺ (**Fig. 18-b**).

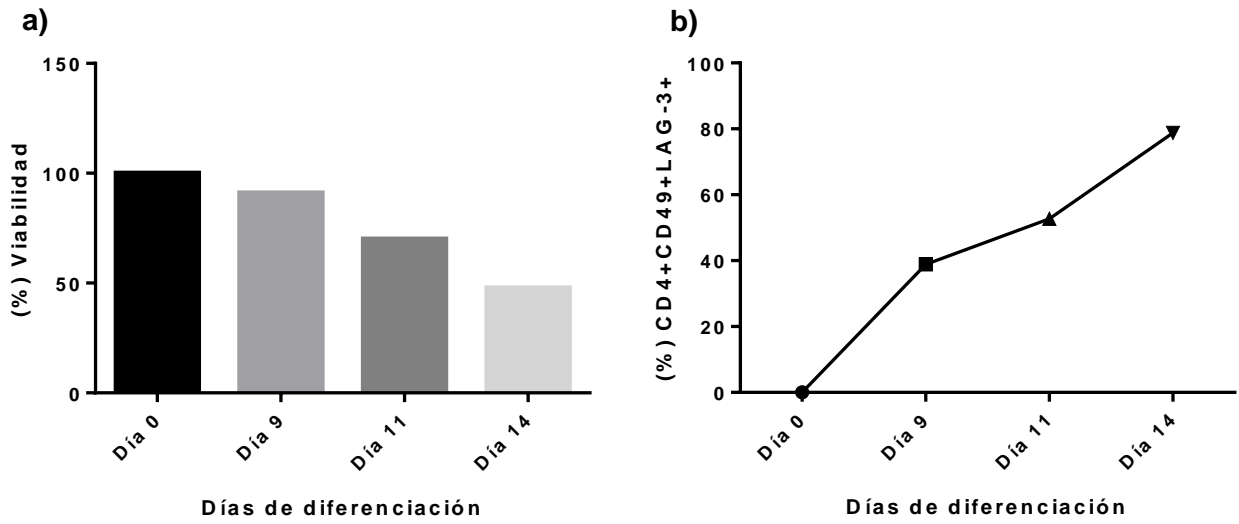


Figura 18. Cinética de diferenciación de células Tr1. a) Gráficas de los porcentajes de viabilidad obtenidos a lo largo de la cinética de diferenciación b) Gráfica de los porcentajes de células CD4+ CD49b+ LAG3+ durante la Cinética de diferenciación realizada durante 14 días (n=1).

7.4 Ensayo de supresión

Bajo nuestras condiciones experimentales, logramos obtener altos porcentajes de linfocitos Tr1 (CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺). Para evaluar su función supresora tras la diferenciación, se realizó un ensayo de supresión aloantígeno específico, mediante co-cultivos de linfocitos T (CD3⁺) como controles de proliferación (células respondedoras) teñidas con CFSE, con Tr1 aisladas por sorting teñidas con CTV (1:2 respectivamente) y DC alogénicas como estímulo de activación; así como un ensayo de supresión policlonal, realizando co-cultivos de células respondedoras (CD3⁺), con linfocitos Tr1 (1:2 respectivamente) y DynaBeads acopladas a Ab anti-CD3/-CD28 como estímulo de activación. Como controles de activación (0:1), co-cultivamos células respondedoras (CD3⁺) únicamente con DC alogénicas para los ensayos aloantígeno específicos y con DynaBeads para los ensayos de activación policlonal. Los cultivos se incubaron 4 días y posteriormente se evaluó la capacidad supresora de las Tr1 mediante el análisis del índice de división de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ dentro de las células respondedoras (CD3⁺).

Observamos una disminución en la proliferación de las células respondedoras para ambas condiciones (policlonal y aloantígeno específico) tanto en linfocitos T CD4⁺ como en linfocitos T CD8⁺ en los co-cultivos en presencia de linfocitos Tr1 en comparación con los controles de activación (**Fig. 19**). Lo anterior se comprobó obteniendo el índice de división, corroborando así su capacidad supresora tras su diferenciación (**Fig.20**)

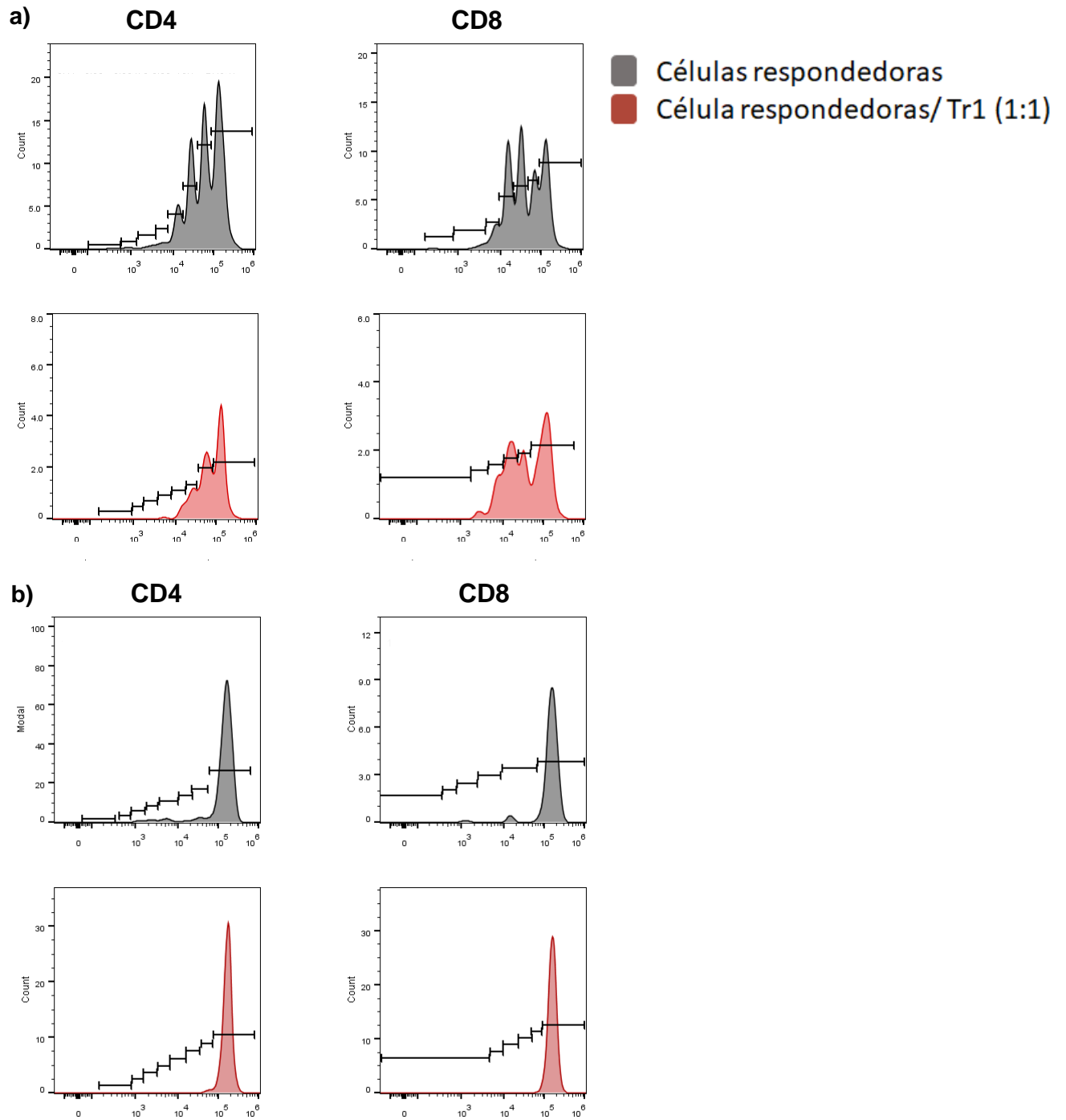


Figura 19. Ensayo de supresión. a) Histogramas representativos del ensayo de supresión con estimulo policlonal. b) Histogramas representativos del ensayo de supresión antígeno específico.

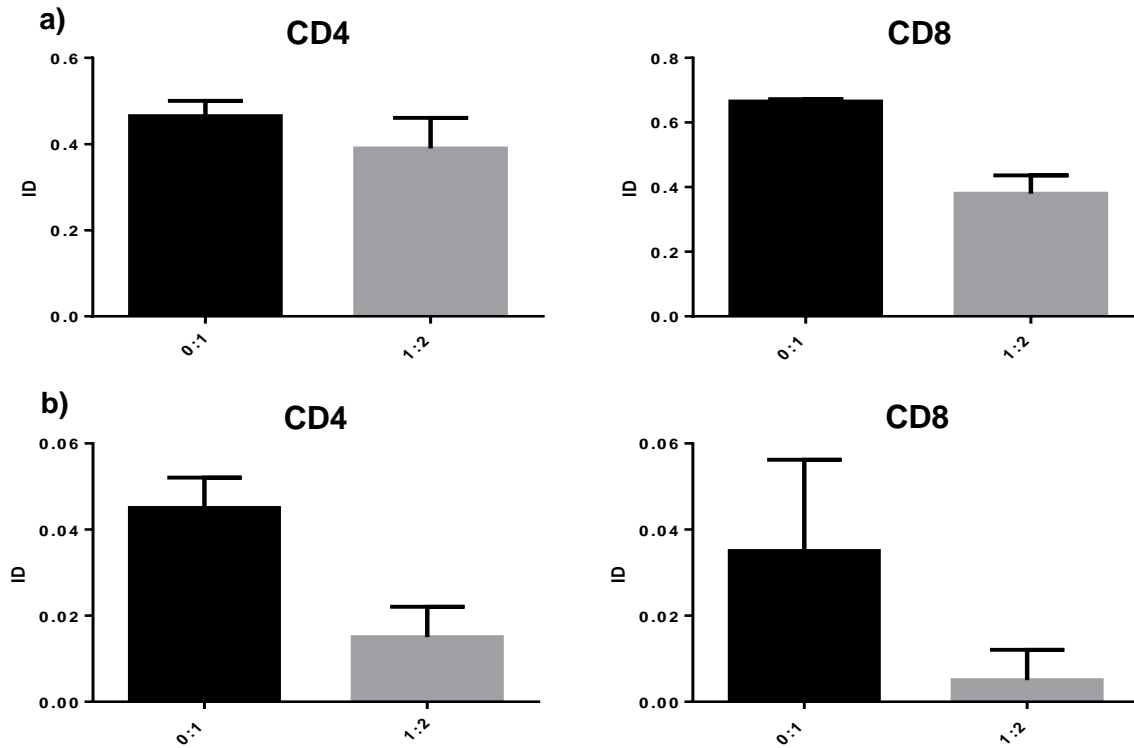


Figura 20. Índice de división. a) Índice de división calculado a partir poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ dentro de las células respondedoras, obtenidos de los ensayos de supresión realizados con estímulos de activación policlonal (n=2), en los que se refiere como "0:1" al control de activación en ausencia de linfocitos Tr1 y "1:2" a los cultivos en presencia de Tr1. b) Índice de división calculado a partir poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ dentro de las células respondedoras, obtenidos de los ensayos de supresión realizados con estímulos de activación alogénico específico (n=2), en los que se refiere como 0:1 al control de activación en ausencia de linfocitos Tr1 y 1:2 a los cultivos en presencia de Tr1.

7.5 Purificación de Tr1 (CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺IL-10⁺)

Hasta este punto, nuestras condiciones previamente estandarizadas nos permitían obtener un sistema altamente eficiente para la diferenciación de células CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺ con capacidad supresora, sin embargo, tras realizar los ensayos de supresión preliminares correspondientes, aún necesitábamos evaluar la producción de IL-10 en estas poblaciones diferenciadas, ya que esta característica es clave para asegurar una alta pureza en las poblaciones de linfocitos Tr1, lo cual podría repercutir en su función, aumentando significativamente la capacidad supresora de estas poblaciones. Lo anterior resulta de gran importancia, ya que se han reportado poblaciones de células tipo Tr1 (tTr1) que expresan los marcadores de superficie descritos para las Tr1, pero que tienen un potencial supresor menor debido a la falta de producción de IL-10 [101, 135]. Por lo anterior, resultaba de gran importancia evaluar la producción de IL-10 en estas células diferenciadas, para purificar únicamente aquellas que cumplían con esta característica. Para ello, realizamos cultivos de diferenciación con las condiciones previamente estandarizadas. Se realizó un ensayo de captura exógena de IL-10: para lo que se estimularon los cultivos de diferenciación con el superantígeno Enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB) al día 13 de diferenciación, con el objetivo de estimular la producción de IL-10 en los cultivos. Posteriormente, los cultivos se incubaron durante 12 horas (37°C/5% CO₂). Al término del tiempo incubación, se recuperaron los co-cultivos para evaluar su fenotipo (CD49b⁺LAG-3⁺) y producción de IL-10, para posteriormente purificar por ““sorting” las Tr1 (CD4⁺CD49b^{hi}LAG-3^{hi}IL-10⁺) (Fig. 21).

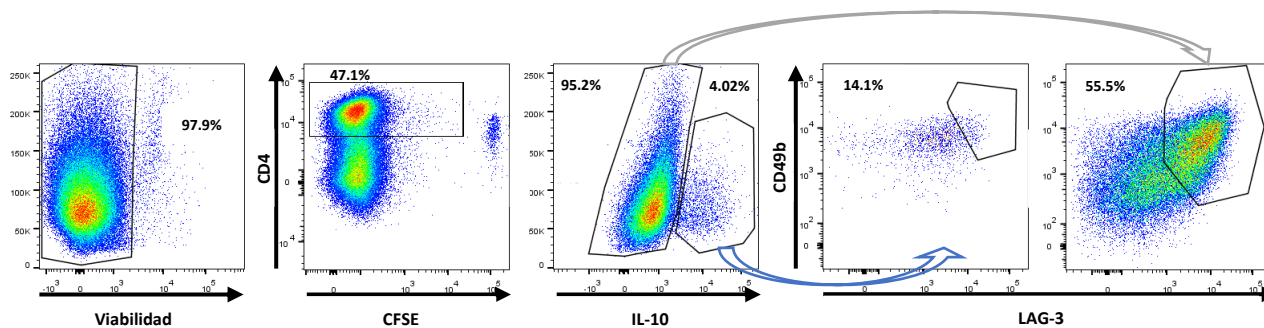


Figura 21. Fenotipo de las células diferenciadas. Estrategia de análisis utilizada para la purificación de los linfocitos Tr1 por "sorting" ($CD4^+CD49b^{hi}LAG-3^{hi}IL-10^+$).

Al evaluar el fenotipo de las células en los cultivos de diferenciación, encontramos que la población de Tr1 productoras de IL-10, se encontraba en porcentajes menores en comparación con las células tTr1, lo que se reflejó en los números obtenidos tras su purificación (**Tabla 9**). Por ello, resultaba de gran importancia estandarizar las condiciones adecuadas para expandir *in vitro* nuestra población de células Tr1 y de esta manera alcanzar los números adecuados para realizar ensayos posteriores (**Fig. 20**).

Muestra	Número de Tr1 purificadas	Número de tTr1 purificadas
1	1,800	20,000
2	435	1,948
3	522	1,244

Tabla 9. Purificación de células Tr1. Número total de células Tr1 ($IL-10^+$) y tTr1 purificadas de 3 muestras.

7.6. Expansión de Tr1

Al purificar los linfocitos Tr1 a partir de los cultivos de diferenciación, se obtuvo una pequeña cantidad, que sería insuficiente para realizar ensayos posteriores, por lo que resultó de gran importancia incrementar los números de Tr1 sin comprometer su fenotipo ni su función, por lo que estandarizamos las condiciones de expansión policlonal *in vitro*.

Una vez purificadas, las Tr1 se cultivaron y se sometieron a ciclos de expansión utilizando perlas acopladas a Abs anti-CD3/CD28, como estímulos de activación, en una proporción subóptima, en conjunto con estímulos con rhIL-2 e rhIL-10 durante 4 días, posteriormente se retiró el estímulo de activación policlonal y sólo se conservó el cultivo en presencia de rhIL-2 durante 3 días (resting). La expansión se llevó a cabo durante 21 días posteriores a su purificación, evaluando periódicamente el incremento de los números tras cada ciclo de expansión, obteniendo un total de 400, 000 células, lo que significó un incremento relativo de casi 1000 veces el número inicial de una de las muestras purificadas (**Fig. 22**).

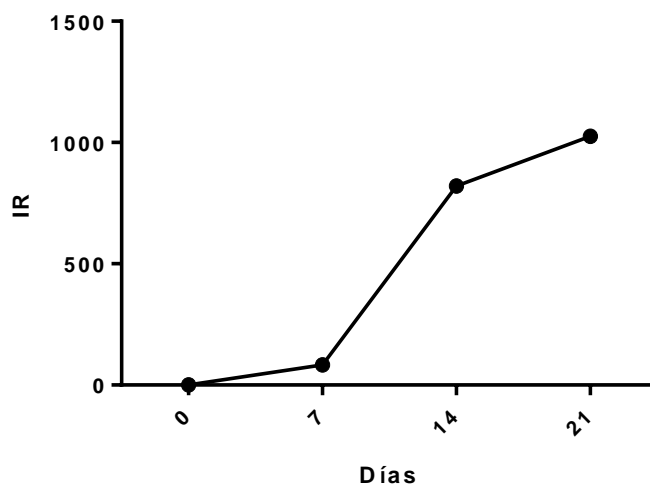


Figura 22. Expansión policlonal de Tr1 aloespecíficas. Incremento Relativo (IR) de Tr1 expandidas *in vitro* durante 21 días.

Finalmente, evaluamos la estabilidad tanto de su fenotipo como de su producción de IL-10 tras ser sometidas a nuestras condiciones de expansión. Encontramos que el 80% del total de nuestra población conservó el fenotipo de CD49b⁺LAG-3⁺ y que de esta población el 88.2% continuaba produciendo IL-10, lo que indica que nuestras condiciones de expansión no comprometen el fenotipo Tr1 de las células (CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺), ni su principal mecanismo de supresión basado en la producción de IL-10, (**Fig. 23**).

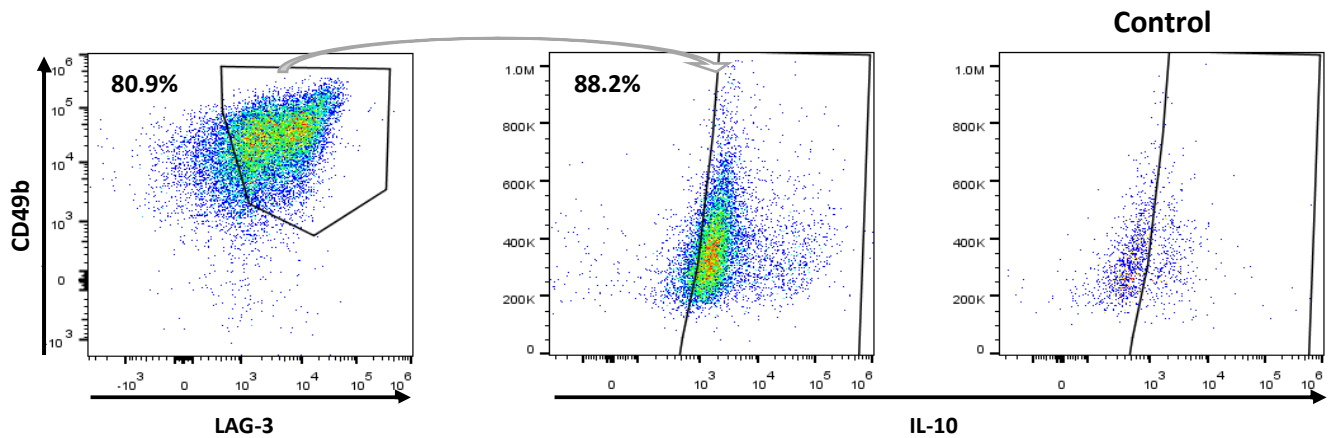


Figura 23. Estabilidad de fenotipo y producción de IL-10 en células Tr1 expandidas. Fenotipo de las células Tr1 expandidas durante 21 días, a la izquierda se muestra la gráfica de puntos de la expresión de CD49b y LAG-3, en el centro se muestra la producción de IL10 y a la derecha el control negativo comparativo de secreción de IL-10.

8. DISCUSION

La terapia celular ha sido ampliamente explorada en modelos animales y, debido su gran eficacia, actualmente se han realizado las primeras pruebas clínicas en pacientes con diversas patologías, entre los que destacan pacientes con trasplante renal que presentan rechazo al injerto, disminuyendo los efectos adversos que se presentan tras el uso cotidiano de los fármacos inmunosupresores, en los que se basan las terapias actuales [136].

Existen diversos linajes celulares del sistema inmunológico que, por sus propiedades tolerogénicas, han sido evaluados para comprobar su posible uso como tratamiento contra el rechazo en trasplante renal. Entre las células propuestas las Tr1 constituyen uno de los linajes con mayor eficacia, no sólo por su gran potencial tolerogénico, sino también porque, a diferencia de otros linajes celulares linfoides como las Treg (FoxP3⁺), las Tr1 cuentan con marcadores de superficie que facilitan su identificación [101], superando así una de las más grandes desventajas que se presentan en el uso de Tregs como terapia celular.

Recientemente, se han publicado las primeras pruebas clínicas en pacientes con trasplante renal, en gran parte gracias al surgimiento de una metodología para la diferenciación *in vitro* de Tr1 aloespecíficas, mediante el uso de células dendríticas tolerogénicas denominadas DC₁₀ [104, 107, 137], que producen altos niveles de IL-10, y que cuentan con la aprobación de los comités internacionales dedicados a la evaluación de metodologías propuestas para su uso en la clínica [137].

Modificando metodologías previamente publicadas [98, 104, 107, 138, 139], en el presente trabajo, establecimos un protocolo para la diferenciación de DC₁₀ a partir de monocitos CD14⁺. Mediante nuestro protocolo de diferenciación, obtuvimos DC que conservaban una alta expresión de CD14, siendo una de las principales diferencias entre DC convencionales y DC₁₀, así como un aumento significativo en la expresión de las moléculas co-inhibitorias ILT4 y HLA-G, las cuales juegan un papel muy importante, no sólo como parte de su fenotipo clásico, sino también en

los procesos de diferenciación de Tr1 a partir de linfocitos Tn. La unión inespecífica al realizar marcajes con anticuerpos en poblaciones celulares, especialmente en aquellas poblaciones que presentan una alta expresión de receptores Fc, es altamente posible, por lo que es recomendable realizar un bloqueo de estos receptores previo al marcaje, lo que disminuiría el riesgo de obtener uniones inespecíficas, sin embargo, aunque durante la evaluación de nuestro fenotipo en las DC₁₀ no realizamos un bloqueo de los receptores Fc previo a los marcajes con mAbs, descartamos las uniones inespecíficas, comparando las DC₁₀ con nuestros controles (DC convencionales) y observamos diferencias significativas en la expresión de estos receptores.. Por lo tanto, en conjunto, la expresión de CD14 así como el aumento en la expresión de ILT4 y HLA-G coinciden con los fenotipos reportados para las DC₁₀ en los que se reportan porcentajes de entre el 70%-80% en la expresión de CD14, entre 40%-90% en la expresión de HLA-G y entre un 35%-90% en la expresión de ILT4 en ensayos *in vitro* [111, 112, 114, 139].

Nuestras condiciones anteriormente establecidas nos permitieron obtener DCs que cumplen con el fenotipo característico para una DC₁₀ (CD11c⁺CD14⁺HLA-G^{hi}ILT4^{hi}) sin embargo, resultaba de gran importancia comprobar su capacidad en la diferenciación a partir de linfocitos Tn en Tr1. Para ello, realizamos co-cultivos alogénicos entre DC₁₀:Tn en 2 proporciones subóptimas (1:5 y 1:10, respectivamente) y además probamos 3 condiciones distintas.

Con el objetivo de mantener un microambiente lo más controlado posible, la primera de nuestras condiciones se basó en realizar co-cultivos con IDC₁₀; de esta manera, sólo participan las interacciones de ILT4 y HLA-G entre las DC₁₀ y los linfocitos Tn, pero no la IL-10 potencialmente producida por las DC₁₀. El segundo elemento sumamente importante en la diferenciación, la IL-10, fue adicionado de manera exógena en una concentración previamente reportada (10 ng/mL) [129]. Sin embargo, al término de los días de co-cultivo, los porcentajes de linfocitos LAG-3⁺CD49b⁺ fueron los más bajos de entre las 3 condiciones que probamos, obteniendo un porcentaje máximo de 15% de células CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺. Estos porcentajes coinciden con los datos previamente reportados en protocolos de diferenciación de Tr1, mediante el uso de IDC₁₀, que varían entre un 11%-15% [139].

Con nuestra segunda condición (co-cultivos de DC₁₀ sin irradiar: Tn) obtuvimos porcentajes de diferenciación (CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺) que duplicaban a los obtenidos con la condición anterior (>20%), de esta manera comprobamos que éstas DC₁₀ parecen proporcionar mediadores al co-cultivo que favorecen la diferenciación de Tr1, además de las moléculas co-inhibitorias HLA-G e ILT4, de entre las cuales, probablemente se encuentre la IL-10, ya que esta citocina es esencial en la diferenciación de Tr1 [98, 140, 141].

Aunque los porcentajes de diferenciación obtenidos con las DC₁₀ sin irradiar fueron considerablemente mayores a los de nuestra condición inicial (IDC₁₀), intentamos una condición extra, en la que aprovechamos todos los elementos que proporciona la DC₁₀ y también adicionamos IL-10 exógena; de esta manera, aseguramos la presencia de esta citocina indispensable para la diferenciación en los cultivos, además del resto de los elementos. Con esta última condición, optimizamos la diferenciación, obteniendo porcentajes de hasta 48.6% de células CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺ en la proporción 1:10 (DC₁₀:Tn). Estos porcentajes de diferenciación superan los reportados en muchos trabajos que no sobrepasan el 15% de células CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺, tanto en modelo murino como en muestras humanas, utilizando DC₁₀ o mediante otros sistemas de diferenciación [104, 124, 139, 142]. Cabe destacar que en las diferentes condiciones evaluadas se incluyó un control negativo de diferenciación, utilizando células dendríticas convencionales (diferenciadas a partir de monocitos con GM-CSF e IL-4), mostrando una nula diferenciación de Tr1.

Durante la evaluación de los fenotipos en los cultivos de diferenciación, se observó una población constante de células CD4⁻CFSE⁻ en todas las condiciones probadas, se ha reportado que tras estímulos de activación prolongada vía TCR/CD3 o CD2, es posible que se induzca una internalización, así como una expresión defectuosa transitoria del CD4 sobre la superficie de los linfocitos, lo que podría explicar la pérdida en la expresión del CD4 en algunos linfocitos sobre-activados, tras los periodos de cultivo en presencia de la DC₁₀ [143, 144].

Aunque logramos estandarizar un protocolo con las condiciones óptimas para la diferenciación de linfocitos Tr1 (CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺), al finalizar los días de cocultivo, la viabilidad se veía comprometida con valores incluso menores al 20%, quizá por el largo periodo de tiempo en los que se llevaba a cabo la diferenciación (14 días). Por ello, se realizó una cinética con el objetivo de encontrar el porcentaje máximo tanto de diferenciación, como de viabilidad en los cultivos. Sin embargo, observamos que los mayores porcentajes de diferenciación se obtenían al día 14 del cocultivo, además de que fue hasta este día cuando se pudo observar una población CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺ más homogénea y definida, lo que resulta de vital importancia para asegurar su identificación y evitar contaminación con otro tipo de células durante la purificación de esta población. Por otra parte, identificamos que la población no viable, no presentó marcaje para ninguno de los dos marcadores fenotípicos de las Tr1 (datos no mostrados). En comparación con otros estudios donde no se toma en cuenta la viabilidad, al adicionar este parámetro nos permitió verificar las proporciones reales de células funcionales en nuestros cultivos de diferenciación, discriminando el marcaje inespecífico que suele presentarse en poblaciones celulares en procesos de muerte, asegurando un mayor rendimiento al purificar nuestras células diferenciadas que se usarían en ensayos posteriores [104, 124, 139, 142] [98, 140, 141].

Tras obtener las condiciones óptimas para la diferenciación de Tr1 *in vitro*, realizamos un ensayo supresión con el objetivo de verificar el potencial supresor en nuestras poblaciones tras su diferenciación. Las Tr1 disminuyeron el índice de división nuestros ensayos con estímulos de activación policlonal, tanto en las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ (Media=0.39) como en CD8⁺ (Media=0.38) con respecto a nuestros controles de activación (Media=0.465 y Media=0.665 respectivamente). De igual manera, se observó una disminución en los índices de división correspondientes a los linfocitos T CD4⁺ (Media= 0.015) y CD8⁺ (0.005) obtenidos en ensayos realizados con estímulos antígeno específicos, con respecto a los controles de activación (Media= 0.045 y Media=0.035). De manera interesante, se observó un mayor efecto en la supresión hacia las poblaciones de linfocitos T CD8⁺, este efecto se conserva tanto en el ensayo con activación policlonal como en

el antígeno específico, siendo una de las poblaciones más importantes que intervienen en los procesos de rechazo al injerto. Por otra parte, el efecto en la supresión dirigida a los linfocitos T CD4⁺ parece tener un mayor efecto en el ensayo antígeno específico, en comparación con el policlonal. De esta manera, comprobamos la funcionalidad de las Tr1 tras su diferenciación *in vitro* bajo nuestras condiciones.

Existen reportes de poblaciones celulares que, a pesar de expresar el fenotipo específico para las Tr1 [135], cuentan con un potencial supresor disminuido debido a que no producen IL-10 [135]. Debido a lo anterior, para optimizar la purificación de las células Tr1 aloespecíficas, era importante comprobar su capacidad de producir IL-10, para asegurar la obtención de las Tr1 (CD49b⁺LAG-3⁺IL-10⁺) con el mayor potencial supresor. Para detectar IL-10 en las Tr1 se optimizó la metodología utilizando un estímulo fuerte, como el superantígeno SEB. El superantígeno es un antígeno que induce el entrecruzamiento del TCR de manera externa al sitio de reconocimiento del péptido, uniéndose a regiones no polimórficas de cadenas V β específicas [145, 146]. Además, se utilizó un sistema de detección mejorado, que permite capturar la IL-10 en la superficie de las células (IL-10 secretion assay, Miltenyi Biotech) como ha sido previamente reportado [101]. Esto permitió evaluar el porcentaje de Tr1 que realmente eran productoras de IL-10.

Posterior a la purificación de las Tr1 (CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺IL-10⁺), los números totales de Tr1 IL-10⁺ obtenidos fueron insuficientes para realizar ensayos posteriores de supresión (entre 400-1500 Tr1). Debido a que se ha reportado la dosis requerida para el uso de Tr1 en terapia es de 2x10⁶ Tr1 por Kg del paciente [124, 147, 148], fue necesario estandarizar un protocolo para la expansión *in vitro* de estas células, que no comprometiera su estabilidad a largo plazo. Las condiciones establecidas para la expansión de las Tr1, no sólo nos permitieron incrementar el número de Tr1 hasta 1000 veces el número inicial, sino que también, nos permitieron conservar tanto su fenotipo como la producción de IL-10.

Resulta de gran importancia la estandarización de este protocolo de expansión ya que no se había descrito antes un protocolo que permitiera la expansión de las Tr1

con una alta eficiencia en su estabilidad fenotípica y funcional, lo que podría ayudar no sólo en su implementación para alcanzar los números necesarios durante una terapia de reinfusión a los pacientes con trasplante renal, sino que también ayudaría a expandir los reducidos números obtenidos tras la diferenciación para abordar aspectos acerca de la biología de las Tr1 aún no explorados, como; la estabilidad de sus fenotipos (plasticidad fenotípica en presencia de citocinas pro-inflamatorias), marcadores epigenéticos específicos, producción de IL-10 en ambientes inflamatorios, comparación entre Tr1 obtenidas *ex vivo* con las diferenciadas *in vitro*, entre otros aspectos importantes para la mejor comprensión de este linaje celular.

Aunque el objetivo final de nuestro proyecto es la implementación de nuestra metodología como terapia celular en pacientes, aún existen algunos aspectos relevantes en la metodología que deben ser evaluados (ensayos funcionales, estabilidad en presencia de citocinas proinflamatorias, entre otras). Una vez cubiertos todos los puntos concernientes a la metodología, con base en trabajos publicados, será necesario comenzar con la validación de nuestro protocolo de inducción y expansión de acuerdo a las normas oficiales que establecen diversas instituciones como la Food and Drug Administration (FDA), ONE study, Agencia Europea de Medicamentos, entre otras; y realizar los cambios pertinentes en la metodología o materiales usados, así como realizar las pruebas pertinentes para validarlos para su uso en pruebas clínicas.

9. CONCLUSIONES

- Se consiguió la diferenciación *in vitro* de células DC₁₀ con fenotipo HLA-G⁺ILT4⁺.
- Se estandarizó un protocolo de generación y expansión de células Tr1 aloespecíficas, modificando un protocolo previamente autorizado para su uso en pruebas clínicas.
- Se optimizó la diferenciación de linfocitos CD49b⁺LAG-3⁺ productores de IL-10 (Tr1).
- Obtuvimos las condiciones óptimas para el protocolo de expansión que mantiene la estabilidad fenotípica y funcional en las Tr1.
- Se estandarizó el ensayo de supresión de Tr1 aloespecífica, con células CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺ purificadas por sorting.

10. PERSPECTIVAS

- Evaluar la capacidad supresora de las Tr1 CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺ IL-10⁺ expandidas mediante ensayos funcionales.
- Evaluar la estabilidad de las Tr1 en presencia de interleucinas proinflamatorias durante la expansión y en ensayos funcionales.
- Implementar el protocolo en muestras de pacientes pre- y post- trasplantados.

11. LITERATURA CITADA

1. Cosio, F.G., et al., *Predicting subsequent decline in kidney allograft function from early surveillance biopsies*. Am J Transplant, 2005. **5**(10): p. 2464-72.
2. Massy, Z.A., et al., *Chronic renal allograft rejection: immunologic and nonimmunologic risk factors*. Kidney Int, 1996. **49**(2): p. 518-24.
3. Game, D.S. and R.I. Lechler, *Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance*. Transpl Immunol, 2002. **10**(2-3): p. 101-8.
4. Marino, J., J. Paster, and G. Benichou, *Allorecognition by T Lymphocytes and Allograft Rejection*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 582.
5. Keşmir, C., J.A.M. Borghans, and R.J. de Boer, *Diversity of Human $\alpha\beta$ T Cell Receptors*. Science, 2000. **288**(5469): p. 1135-1135.
6. den Haan, J.M., et al., *The minor histocompatibility antigen HA-1: a diallelic gene with a single amino acid polymorphism*. Science, 1998. **279**(5353): p. 1054-7.
7. Rogers, N.J. and R.I. Lechler, *Allorecognition*. American Journal of Transplantation, 2002. **1**(2): p. 97-102.
8. Dickinson, A.M. and D. Charron, *Non-HLA immunogenetics in hematopoietic stem cell transplantation*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(5): p. 517-25.
9. Goulmy, E., *Minor histocompatibility antigens: from transplantation problems to therapy of cancer*. Hum Immunol, 2006. **67**(6): p. 433-8.
10. Ingulli, E., *Mechanism of cellular rejection in transplantation*. Pediatr Nephrol, 2010. **25**(1): p. 61-74.
11. Ali, J.M., et al., *Allorecognition pathways in transplant rejection and tolerance*. Transplantation, 2013. **96**(8): p. 681-8.
12. Jiang, S., O. Herrera, and R.I. Lechler, *New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(5): p. 550-7.
13. Becker, L.E., C. Morath, and C. Suesal, *Immune mechanisms of acute and chronic rejection*. Clin Biochem, 2016. **49**(4-5): p. 320-3.
14. Alegre, M.L., F.G. Lakkis, and A.E. Morelli, *Antigen Presentation in Transplantation*. Trends Immunol, 2016. **37**(12): p. 831-843.
15. Boardman, D.A., et al., *What Is Direct Allorecognition?* Curr Transplant Rep, 2016. **3**(4): p. 275-283.
16. Boardman, D.A., et al., *What Is Direct Allorecognition?* Current Transplantation Reports, 2016. **3**(4): p. 275-283.
17. Hornick, P. and R. Lechler, *Direct and indirect pathways of alloantigen recognition: relevance to acute and chronic allograft rejection*. Nephrol Dial Transplant, 1997. **12**(9): p. 1806-10.
18. Bai, n.B., M.R. Vas, and n.L. Lowenstein, *1964. The development of large immature mononuclear cells in mixed leukocyte cultures*. Transplantation, 1964. **2**(4): p. 564.
19. Lafferty, K.J., et al., *Thyroid allograft immunogenicity is reduced after a period in organ culture*. Science, 1975. **188**(4185): p. 259.
20. Pietra, B.A., et al., *CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II*. J Clin Invest, 2000. **106**(8): p. 1003-10.
21. Lechler, R., R. Batchelor, and G. Lombardi, *The Relationship between Mhc Restricted and Allospecific T-Cell Recognition*. Immunology Letters, 1991. **29**(1-2): p. 41-50.
22. Lechler, R., R. Batchelor, and G. Lombardi, *The relationship between MHC restricted and allospecific T cell recognition*. Immunol Lett, 1991. **29**(1-2): p. 41-50.

23. Auchincloss, H., et al., *The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993. **90**(8): p. 3373-3377.
24. Lakkis, F.G. and R.I. Lechler, *Origin and Biology of the Allogeneic Response*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2013. **3**(8).
25. Tittelbach-Helmrich, D., et al., *Hyperacute rejection of a living unrelated kidney graft*. Case Rep Med, 2014. **2014**: p. 613641.
26. Kissmeyer-Nielsen, F., et al., *Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells*. Lancet, 1966. **2**(7465): p. 662-5.
27. Dalmaso, A.P., et al., *Mechanism of complement activation in the hyperacute rejection of porcine organs transplanted into primate recipients*. The American Journal of Pathology, 1992. **140**(5): p. 1157-1166.
28. Fodor, W.L., et al., *Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogeneic hyperacute organ rejection*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994. **91**(23): p. 11153.
29. Moreau, A., et al., *Effector Mechanisms of Rejection*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2013. **3**(11): p. a015461.
30. Benzimra, M., G.L. Calligaro, and A.R. Glanville, *Acute rejection*. J Thorac Dis, 2017. **9**(12): p. 5440-5457.
31. Dogan, N., et al., *Acute allograft rejection in liver transplant recipients: Incidence, risk factors, treatment success, and impact on graft failure*. J Int Med Res, 2018. **46**(9): p. 3979-3990.
32. MacMillan-Crow, L.A., et al., *Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(21): p. 11853.
33. Libby, P. and J.S. Pober, *Chronic rejection*. Immunity, 2001. **14**(4): p. 387-97.
34. TILNEY, N.L., et al., *CHRONIC REJECTION—AN UNDEFINED CONUNDRUM*. Transplantation, 1991. **52**(3): p. 389-398.
35. LaRosa, D.F., A.H. Rahman, and L.A. Turka, *The innate immune system in allograft rejection and tolerance*. J Immunol, 2007. **178**(12): p. 7503-9.
36. Murphy, S.P., P.M. Porrett, and L.A. Turka, *Innate immunity in transplant tolerance and rejection*. Immunol Rev, 2011. **241**(1): p. 39-48.
37. Sacks, S.H. and W. Zhou, *The role of complement in the early immune response to transplantation*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(6): p. 431-42.
38. Moreau, A., et al., *Effector mechanisms of rejection*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. **3**(11).
39. Spahn, J.H., W. Li, and D. Kreisel, *Innate immune cells in transplantation*. Curr Opin Organ Transplant, 2014. **19**(1): p. 14-9.
40. Brändle, D., et al., *CONTRIBUTION OF DONOR-SPECIFIC ANTIBODIES TO ACUTE ALLOGRAFT REJECTION: Evidence from B Cell-Deficient Mice*. Transplantation, 1998. **65**(11): p. 1489-1493.
41. Wasowska, B.A., et al., *PASSIVE TRANSFER OF ALLOANTIBODIES RESTORES ACUTE CARDIAC REJECTION IN IgKO MICE1,2*. Transplantation, 2001. **71**(6): p. 727-736.
42. Farkas, A.M., et al., *Allograft rejection is associated with development of functional IgE specific for donor MHC antigens*. Journal of Allergy and Clinical Immunology.
43. Hall, B.M., *Cells mediating allograft rejection*. Transplantation, 1991. **51**(6): p. 1141-51.
44. Zachary, A.A., et al., *Immunogenetics and immunology in transplantation*. Immunol Res, 2010. **47**(1-3): p. 232-9.

45. Lechler, R.I. and J.R. Batchelor, *Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells*. J Exp Med, 1982. **155**(1): p. 31-41.
46. Turka, L.A., et al., *T-cell activation by the CD28 ligand B7 is required for cardiac allograft rejection in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. **89**(22): p. 11102.
47. Hancock, W.W., et al., *Requirement of the Chemokine Receptor CXCR3 for Acute Allograft Rejection*. The Journal of Experimental Medicine, 2000. **192**(10): p. 1515.
48. Besançon, A., et al., *Differential Impact of T-bet and IFN γ on Pancreatic Islet Allograft Rejection*. Transplantation, 2018. **102**(9): p. 1496-1504.
49. Sugiura, D., et al., *Differential effector mechanisms induced by vaccination with MUC1 DNA in the rejection of colon carcinoma growth at orthotopic sites and metastases*. Cancer Sci, 2008. **99**(12): p. 2477-84.
50. Liu, Z., H. Fan, and S. Jiang, *CD4(+) T-cell subsets in transplantation*. Immunol Rev, 2013. **252**(1): p. 183-91.
51. Mathews, D.V., et al., *CD122 signaling in CD8+ memory T cells drives costimulation-independent rejection*. J Clin Invest, 2018. **128**(10): p. 4557-4572.
52. Benichou, G., et al., *Role of Memory T Cells in Allograft Rejection and Tolerance*. Frontiers in Immunology, 2017. **8**(170).
53. Hartono, C., T. Muthukumar, and M. Suthanthiran, *Immunosuppressive drug therapy*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. **3**(9): p. a015487.
54. Halloran, P.F., *Immunosuppressive drugs for kidney transplantation*. N Engl J Med, 2004. **351**(26): p. 2715-29.
55. Makinodan, T., G.W. Santos, and R.P. Quinn, *IMMUNOSUPPRESSIVE DRUGS*. Pharmacological Reviews, 1970. **22**(2): p. 189.
56. Berthoux, F., et al., *Antithymocyte Globulin (ATG) Induction Therapy and Disease Recurrence in Renal Transplant Recipients With Primary IgA Nephropathy*. Transplantation, 2008. **85**(10): p. 1505-1507.
57. Mohty, M., *Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond*. Leukemia, 2007. **21**: p. 1387.
58. Kandus, A., et al., *Basiliximab Versus Daclizumab Combined With Triple Immunosuppression in Deceased Donor Renal Transplantation: A Prospective, Randomized Study*. Transplantation, 2010. **89**(8): p. 1022-1027.
59. Webster, A.C., et al., *Interleukin 2 receptor antagonists for renal transplant recipients: a meta-analysis of randomized trials*. Transplantation, 2004. **77**(2): p. 166-176.
60. Hartono, C., T. Muthukumar, and M. Suthanthiran, *Immunosuppressive Drug Therapy*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2013. **3**(9).
61. Berard, J.L., et al., *A review of interleukin-2 receptor antagonists in solid organ transplantation*. Pharmacotherapy, 1999. **19**(10): p. 1127-37.
62. Webster, A.C., et al., *Interleukin 2 receptor antagonists for kidney transplant recipients*. Cochrane Database Syst Rev, 2010(1): p. Cd003897.
63. Marcen, R., *Immunosuppressive drugs in kidney transplantation: impact on patient survival, and incidence of cardiovascular disease, malignancy and infection*. Drugs, 2009. **69**(16): p. 2227-43.
64. Hess, A.D. and P.M. Colombani, *Mechanism of action of cyclosporine: role of calmodulin, cyclophilin, and other cyclosporine-binding proteins*. Transplant Proc, 1986. **18**(6 Suppl 5): p. 219-37.
65. Larson, T.S., et al., *Complete avoidance of calcineurin inhibitors in renal transplantation: a randomized trial comparing sirolimus and tacrolimus*. Am J Transplant, 2006. **6**(3): p. 514-22.

66. Li, J., S.G. Kim, and J. Blenis, *Rapamycin: one drug, many effects*. Cell Metab, 2014. **19**(3): p. 373-9.
67. Ehninger, D., F. Neff, and K. Xie, *Longevity, aging and rapamycin*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2014. **71**(22): p. 4325-4346.
68. Denton, M.D., C.C. Magee, and M.H. Sayegh, *Immunosuppressive strategies in transplantation*. Lancet, 1999. **353**(9158): p. 1083-91.
69. Alice Long, S. and J.H. Buckner, *CD4(+)FOXP3(+) Treg in human autoimmunity: more than a numbers game*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2011. **187**(5): p. 2061-2066.
70. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
71. Bonomo, A., et al., *Pathogenesis of post-thymectomy autoimmunity. Role of syngeneic MLR-reactive T cells*. The Journal of Immunology, 1995. **154**(12): p. 6602.
72. *Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation*. The Journal of Experimental Medicine, 1996. **184**(2): p. 387-396.
73. Powrie, F. and D. Mason, *OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset*. J Exp Med, 1990. **172**(6): p. 1701-8.
74. Morrissey, P.J., et al., *CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells*. J Exp Med, 1993. **178**(1): p. 237-44.
75. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. The Journal of Immunology, 1995. **155**(3): p. 1151.
76. Sakaguchi, S., et al., *Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease*. Immunol Rev, 2006. **212**: p. 8-27.
77. Morikawa, H., et al., *Differential roles of epigenetic changes and Foxp3 expression in regulatory T cell-specific transcriptional regulation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014.
78. Josefowicz, S.Z., L.F. Lu, and A.Y. Rudensky, *Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 531-64.
79. Miyara, M. and S. Sakaguchi, *Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression*. Trends Mol Med, 2007. **13**(3): p. 108-16.
80. Walsh, P.T., D.K. Taylor, and L.A. Turka, *Tregs and transplantation tolerance*. J Clin Invest, 2004. **114**(10): p. 1398-403.
81. Sojka, D.K., Y.H. Huang, and D.J. Fowell, *Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target*. Immunology, 2008. **124**(1): p. 13-22.
82. Soliman, H., M. Mediavilla-Varela, and S. Antonia, *Indoleamine 2,3-Dioxygenase: Is It an Immune Suppressor?* Cancer journal (Sudbury, Mass.), 2010. **16**(4): p. 10.1097/PPO.0b013e3181eb3343.
83. Shepard, M.T. and E.A. Bonney, *PD-1 regulates T cell proliferation in a tissue and subset specific manner during normal mouse pregnancy*. Immunological investigations, 2013. **42**(5): p. 385-408.
84. Kelly, A., et al., *Chapter Four - Regulation of Innate and Adaptive Immunity by TGFβ, in Advances in Immunology*, F.W. Alt, Editor. 2017, Academic Press. p. 137-233.
85. David, C.J. and J. Massagué, *Contextual determinants of TGFβ action in development, immunity and cancer*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2018. **19**(7): p. 419-435.
86. Akhurst, R.J. and A. Hata, *Targeting the TGFβ signalling pathway in disease*. Nat Rev Drug Discov, 2012. **11**(10): p. 790-811.

87. Bae, J., et al., *Trafficking of LAG-3 to the surface on activated T cells via its cytoplasmic domain and protein kinase C signaling*. J Immunol, 2014. **193**(6): p. 3101-12.
88. Wu, T., et al., *Immunosuppressive drugs on inducing Ag-specific CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Treg cells during immune response in vivo*. Transpl Immunol, 2012. **27**(1): p. 30-8.
89. Scandling, J.D., et al., *Tolerance and withdrawal of immunosuppressive drugs in patients given kidney and hematopoietic cell transplants*. Am J Transplant, 2012. **12**(5): p. 1133-45.
90. Baan, C.C., et al., *Differential effect of calcineurin inhibitors, anti-CD25 antibodies and rapamycin on the induction of FOXP3 in human T cells*. Transplantation, 2005. **80**(1): p. 110-7.
91. Zeiser, R., et al., *Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production*. Blood, 2006. **108**(1): p. 390-9.
92. Noris, M., et al., *Regulatory T cells and T cell depletion: role of immunosuppressive drugs*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(3): p. 1007-18.
93. Coenen, J.J., et al., *Rapamycin, and not cyclosporin A, preserves the highly suppressive CD27+ subset of human CD4+CD25+ regulatory T cells*. Blood, 2006. **107**(3): p. 1018-23.
94. Vaikunthanathan, T., et al., *Regulatory T cells: tolerance induction in solid organ transplantation*. Clin Exp Immunol, 2017. **189**(2): p. 197-210.
95. Braza, F., et al., *Regulatory T Cells in Kidney Transplantation: New Directions?* Am J Transplant, 2015. **15**(9): p. 2288-300.
96. Bacchetta, R., et al., *High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells*. J Exp Med, 1994. **179**(2): p. 493-502.
97. Vieira, P., et al., *Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(4): p. 1172-6.
98. Roncarolo, M.G., et al., *Tr1 cells and the counter-regulation of immunity: natural mechanisms and therapeutic applications*. Curr Top Microbiol Immunol, 2014. **380**: p. 39-68.
99. Battaglia, M., et al., *Tr1 cells: From discovery to their clinical application*. Seminars in Immunology, 2006. **18**(2): p. 120-127.
100. Groux, H., et al., *A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis*. Nature, 1997. **389**(6652): p. 737-42.
101. Gagliani, N., et al., *Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells*. Nat Med, 2013. **19**(6): p. 739-46.
102. Roncarolo, M.G., et al., *Type 1 T regulatory cells*. Immunol Rev, 2001. **182**: p. 68-79.
103. Mayo, L., et al., *IL-10-dependent Tr1 cells attenuate astrocyte activation and ameliorate chronic central nervous system inflammation*. Brain, 2016. **139**(Pt 7): p. 1939-57.
104. Petrelli, A., et al., *Generation of Donor-specific T Regulatory Type 1 Cells From Patients on Dialysis for Cell Therapy After Kidney Transplantation*. Transplantation, 2015. **99**(8): p. 1582-9.
105. Comi, M., G. Amodio, and S. Gregori, *Interleukin-10-Producing DC-10 Is a Unique Tool to Promote Tolerance Via Antigen-Specific T Regulatory Type 1 Cells*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 682.
106. Pacciani, V., et al., *Induction of anergic allergen-specific suppressor T cells using tolerogenic dendritic cells derived from children with allergies to house dust mites*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(3): p. 727-36.
107. Gregori, S., et al., *Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway*. Blood, 2010. **116**(6): p. 935-44.

108. Ristich, V., et al., *Mechanisms of prolongation of allograft survival by HLA-G/ILT4-modified dendritic cells*. Hum Immunol, 2007. **68**(4): p. 264-71.
109. Allan, D.S., A.J. McMichael, and V.M. Braud, *The ILT family of leukocyte receptors*. Immunobiology, 2000. **202**(1): p. 34-41.
110. Kostlin, N., et al., *HLA-G promotes myeloid-derived suppressor cell accumulation and suppressive activity during human pregnancy through engagement of the receptor ILT4*. Eur J Immunol, 2017. **47**(2): p. 374-384.
111. Amodio, G., et al., *HLA-G expressing DC-10 and CD4(+) T cells accumulate in human decidua during pregnancy*. Hum Immunol, 2013. **74**(4): p. 406-11.
112. Liang, S. and A. Horuzsko, *Mobilizing dendritic cells for tolerance by engagement of immune inhibitory receptors for HLA-G*. Hum Immunol, 2003. **64**(11): p. 1025-32.
113. Gregori, S., *Editorial: HLA-G-Mediated Immune Tolerance: Past and New Outlooks*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 653.
114. Curigliano, G., et al., *Molecular pathways: human leukocyte antigen G (HLA-G)*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(20): p. 5564-71.
115. Wang, J.P. and G.F. Ou-Yang, *[Mechanism of HLA-G participation in inhibiting lymphocyte proliferation by amniotic mesenchymal stem cells]*. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2014. **22**(1): p. 187-91.
116. Moore, K.W., et al., *Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1*. Science, 1990. **248**(4960): p. 1230-4.
117. Ouyang, W., et al., *Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 71-109.
118. Asadullah, K., W. Sterry, and H.D. Volk, *Interleukin-10 therapy--review of a new approach*. Pharmacol Rev, 2003. **55**(2): p. 241-69.
119. Saraiva, M. and A. O'Garra, *The regulation of IL-10 production by immune cells*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(3): p. 170-81.
120. Iyer, S.S. and G. Cheng, *Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease*. Crit Rev Immunol, 2012. **32**(1): p. 23-63.
121. Battaglia, M., et al., *Tr1 cells: from discovery to their clinical application*. Semin Immunol, 2006. **18**(2): p. 120-7.
122. Thrower, S.L., et al., *Proinsulin peptide immunotherapy in type 1 diabetes: report of a first-in-man Phase I safety study*. Clin Exp Immunol, 2009. **155**(2): p. 156-65.
123. Streeter, H.B., et al., *Preclinical development and first-in-human study of ATX-MS-1467 for immunotherapy of MS*. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm, 2015. **2**(3): p. e93.
124. Mfarrej, B., et al., *Generation of donor-specific Tr1 cells to be used after kidney transplantation and definition of the timing of their in vivo infusion in the presence of immunosuppression*. J Transl Med, 2017. **15**(1): p. 40.
125. Mauri, C., et al., *Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells*. J Exp Med, 2003. **197**(4): p. 489-501.
126. Kemper, C., et al., *Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype*. Nature, 2003. **421**(6921): p. 388-92.
127. Bacchetta, R., et al., *Molecular and functional characterization of allogeneic-specific anergic T cells suitable for cell therapy*. Haematologica, 2010. **95**(12): p. 2134-43.
128. Locafaro, G., et al., *IL-10-Engineered Human CD4(+) Tr1 Cells Eliminate Myeloid Leukemia in an HLA Class I-Dependent Mechanism*. Mol Ther, 2017. **25**(10): p. 2254-2269.
129. George, B., *Regulations and guidelines governing stem cell based products: Clinical considerations*. Perspectives in clinical research, 2011. **2**(3): p. 94-99.
130. Ancans, J., *Cell therapy medicinal product regulatory framework in Europe and its application for MSC-based therapy development*. Frontiers in Immunology, 2012. **3**(253).

131. The Committee for Advanced, T., et al., *Challenges with advanced therapy medicinal products and how to meet them*. Nature Reviews Drug Discovery, 2010. **9**: p. 195.
132. Safinia, N., et al., *Cell Therapy in Organ Transplantation: Our Experience on the Clinical Translation of Regulatory T Cells*. Frontiers in Immunology, 2018. **9**(354).
133. Pellerin, L., et al., *Peanut-specific type 1 regulatory T cells induced in vitro from allergic subjects are functionally impaired*. J Allergy Clin Immunol, 2018. **141**(1): p. 202-213 e8.
134. Mfarrej, B., et al., *Generation of donor-specific Tr1 cells to be used after kidney transplantation and definition of the timing of their in vivo infusion in the presence of immunosuppression*. Journal of Translational Medicine, 2017. **15**(1): p. 40.
135. Clemente-Casares, X., et al., *Expanding antigen-specific regulatory networks to treat autoimmunity*. Nature, 2016. **530**(7591): p. 434-40.
136. Arms, M.A., et al., *Incidence and impact of adverse drug events contributing to hospital readmissions in kidney transplant recipients*. Surgery, 2018. **163**(2): p. 430-435.
137. Geissler, E.K., *The ONE Study compares cell therapy products in organ transplantation: introduction to a review series on suppressive monocyte-derived cells*. Transplant Res, 2012. **1**(1): p. 11.
138. Steinbrink, K., et al., *Pillars Article: Induction of Tolerance by IL-10-Treated Dendritic Cells*. J. Immunol. 1997. **159**: 4772-4780. J Immunol, 2016. **197**(5): p. 1547-55.
139. Amodio, G., et al., *HLA-G expression levels influence the tolerogenic activity of human DC-10*. Haematologica, 2015. **100**(4): p. 548-57.
140. Gregori, S. and M.G. Roncarolo, *Engineered T Regulatory Type 1 Cells for Clinical Application*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 233.
141. Brockmann, L., et al., *IL-10 Receptor Signaling Is Essential for TR1 Cell Function In Vivo*. J Immunol, 2017. **198**(3): p. 1130-1141.
142. Koch, K., et al., *Increased Frequency of CD49b/LAG-3(+) Type 1 Regulatory T Cells in HIV-Infected Individuals*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2015. **31**(12): p. 1238-46.
143. Morel, P., et al., *Down-regulation of cell surface CD4 molecule expression induced by anti-CD4 antibodies in human T lymphocytes*. Cell Immunol, 1992. **145**(2): p. 287-98.
144. Grishkan, I.V., et al., *Helper T cells down-regulate CD4 expression upon chronic stimulation giving rise to double-negative T cells*. Cellular immunology, 2013. **284**(1-2): p. 68-74.
145. White, J., et al., *The V beta-specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice*. Cell, 1989. **56**(1): p. 27-35.
146. Hesse, C., B. Andersson, and A.E. Wold, *Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic interleukin-12 (IL-12) while gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production*. Infect Immun, 2000. **68**(6): p. 3581-6.
147. van der Net, J.B., et al., *Regulatory T cells: first steps of clinical application in solid organ transplantation*. Transpl Int, 2016. **29**(1): p. 3-11.
148. Tang, Q. and J.A. Bluestone, *Regulatory T-cell therapy in transplantation: moving to the clinic*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. **3**(11).