



UNIVERSITAT DE BARCELONA



FACULTAT DE FARMÀCIA

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

**Estudios sobre la inducción de tolerancia
inmunológica mediante la expresión de
antígenos en células hematopoyéticas murinas.
Aplicación a un modelo experimental de
enfermedad autoinmune.**

Herena Eixarch Ahufinger
2008

INTRODUCCIÓN

1- EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO: DESARROLLO Y ESTRUCTURA

La hematopoyesis es el proceso encargado de generar y renovar constantemente todos los tipos celulares que forman la sangre y el sistema inmunitario. La médula ósea (MO) es el principal órgano hematopoyético del individuo adulto.

La homeostasis del sistema hematopoyético está finamente regulada por diferentes tipos celulares que forman parte del propio sistema y por otras células o elementos que forman parte del microambiente hematopoyético, como son las células estromales y distintos componentes de la matriz extracelular (Fig. 1). Además de las células hematopoyéticas y de las células madre hematopoyéticas (CMH), este microambiente está constituido por osteocitos, células mesenquimales, células endoteliales, adipocitos y macrófagos, entre otros.

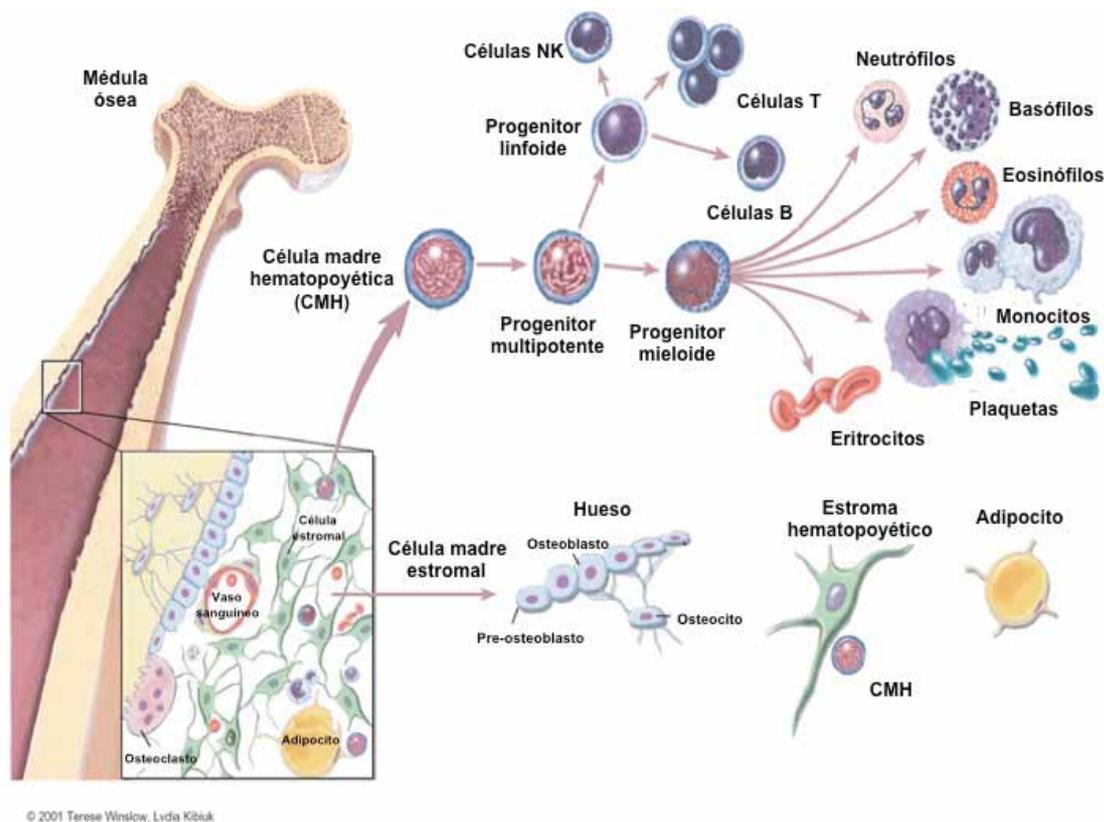


Fig. 1- Estructura del sistema hematopoyético. El sistema hematopoyético es un tejido heterogéneo y jerárquico constituido por células maduras de los diferentes linajes hematopoyéticos (linfóide y mielóide) así como células más o menos inmaduras que dan soporte a la hematopoyesis. Además de ser el soporte físico para las CMH, el microambiente hematopoyético regula el mantenimiento de la hematopoyesis mediante el contacto célula-célula o bien secretando factores que regulan el crecimiento y la diferenciación.

Figura adaptada de Terese Winslow y Lidia Kibiuk, 2001©

Las células más indiferenciadas constituyen el compartimiento de CMH. Es la población menos representada en la MO, con una frecuencia estimada de 1 por cada 10^4 - 10^5 células mononucleadas (CMN) en el ratón y unas 10 veces menos en los humanos. Las CMH se caracterizan y se definen por su capacidad de autorrenovación y multipotencialidad. En un momento determinado, sólo una pequeña fracción de las CMH está dividiéndose para proporcionar las 10^{11} - 10^{12} células hematopoyéticas maduras que un humano adulto necesita diariamente, así como mantener el compartimiento de CMH, mientras que el resto se mantienen en estado quiescente (Go) (Congdon and Reya 2008; Giebel and Punzel 2008).

No se conoce ningún marcador específico para las CMH, aunque se han descrito algunas moléculas de superficie que están asociadas en mayor o menor medida a este tipo celular. Las células de MO de ratón con capacidad de repoblación a largo plazo se encuentran fundamentalmente entre una población caracterizada fenotípicamente por la ausencia de expresión de marcadores de linaje (Lin^-) y por la expresión de los marcadores Sca-1 y c-Kit. La población Lin^- , Sca-1⁺ y c-Kit⁺ posee elevada capacidad de repoblación hematopoyética a largo plazo cuando se trasplanta a ratones irradiados letalmente. Se sabe que un número reducido de estas células es suficiente para generar un nuevo sistema hematopoyético y mantener los linajes derivados de éste a lo largo de la vida del animal (repoblación a largo plazo) (Spangrude et al. 1988; Li and Johnson 1995). Más recientemente se ha descrito una población celular en la MO, las células *Side Population*, que se distingue del resto por su capacidad para extruir el colorante Hoechst 33342 y que estaría enriquecida unas 1000 veces en capacidad de repoblación a largo plazo (Goodell et al. 1996). Los estudios fenotípicos han demostrado que la mayoría de las células *Side Population* comparten marcadores “clásicos” de progenitores inmaduros (Parmar et al. 2003).

Los progenitores hematopoyéticos comprometidos, al contrario que las CMH, tienen una capacidad proliferativa alta pero poca capacidad de autorrenovación. Han perdido multipotencialidad al verse dirigidos a diferenciarse hacia un linaje definido (linfocitos o mielocitos). A medida que aumenta el grado de diferenciación o de compromiso, se distinguen los progenitores linfocitos y los mielocitos, que sólo pueden diferenciarse a linfocitos T, B o células NK en el caso de los progenitores linfocitos, y al resto de células hematopoyéticas (hematocitos, plaquetas, granulocitos, monocitos) en el caso de los progenitores mielocitos (Fig. 2).

En la MO también se encuentran células maduras funcionales o en maduración, que ya no tienen capacidad de autorrenovación y proliferan poco o nada, dependiendo del tipo celular (Fig. 2).

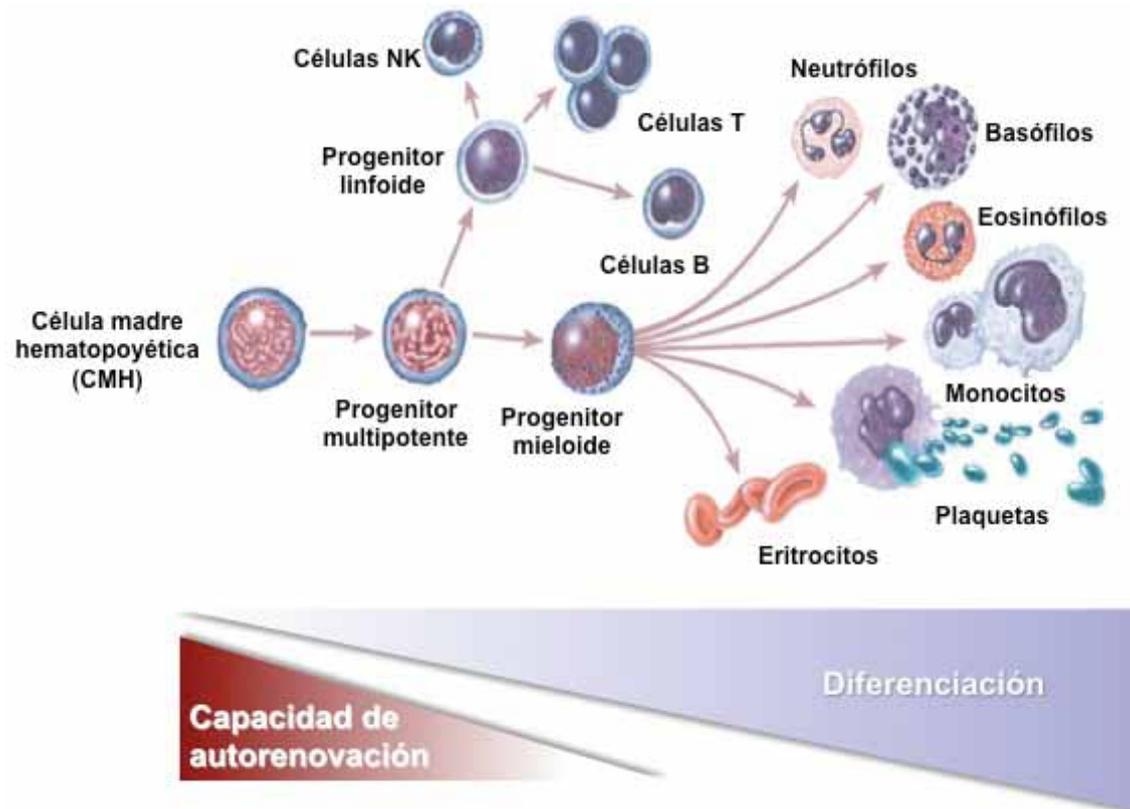


Fig. 2- A medida que las células progenitoras hematopoyéticas se van diferenciando a los diferentes linajes, pierden su pluripotencialidad y capacidad de autorrenovación.

2- TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

El trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) se aplica actualmente para el tratamiento de distintas enfermedades:

- Cánceres hematológicos de origen mieloide (leucemia mieloide aguda y crónica) o de origen linfoide (leucemia linfoblástica, linfomas).
- Aplasia medular por administración de altas dosis de quimioterapia para el tratamiento de tumores sólidos, por exposición a agentes tóxicos o a radiación ionizante.
- Enfermedades genéticas del sistema hematopoyético: inmunodeficiencias severas, anemias hereditarias.
- Enfermedades autoinmunes: esclerosis múltiple, artritis reumatoide. El tratamiento de enfermedades autoinmunes con trasplante de progenitores hematopoyéticos está en fase experimental.

El objetivo del TPH es la restitución del sistema hematopoyético del paciente que ha sido dañado por la terapia anticancerosa, por un nuevo sistema hematopoyético reconstituido a partir de CMH sanas, bien sean propias u obtenidas de un donante sano. En el caso de enfermedades no malignas, el objetivo es simplemente la sustitución del sistema hematopoyético enfermo por otro sano. Se distinguen cuatro clases de TPH según la compatibilidad inmunológica del receptor con el donante: xenotrasplante, alotrasplante, trasplante singénico y trasplante autólogo.

2.1- Tipos de trasplante de progenitores hematopoyéticos

La compatibilidad entre donante y receptor viene dada por la disparidad genética en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) o antígenos leucocitarios humanos (HLA), pero también en los antígenos menores de histocompatibilidad (mHAg). Aunque el donante y el receptor tengan el mismo MHC, el órgano, tejido o las células trasplantadas pueden ser rechazados por incompatibilidad de los mHAg.

En el trasplante xenogénico las células provienen de un donante de una especie diferente. Los xenotrasplantes no se utilizan rutinariamente en el TPH por los enormes problemas infecciosos e inmunológicos que comporta. Aunque se han realizado algunas experiencias piloto, se encuentran todavía en fase experimental. Algunos investigadores piensan que, en el futuro, los xenotrasplantes podrían constituir una terapia alternativa para sustituir el trasplante de órganos de procedencia humana, ya que la donación es, en general, escasa.

En el trasplante alogénico, el donante y el receptor son de la misma especie pero genéticamente distintos. Estas diferencias genéticas se traducen generalmente en problemas de histocompatibilidad y de rechazo (tanto del huésped contra el injerto, como del injerto contra el huésped). Sin embargo, este tipo de reactividad inmune puede tener un poderoso efecto antileucemia del que carecerían los trasplantes autólogos. Así, en pacientes con cánceres hematológicos, el donante ideal es el que comparte los dos haplotipos HLA (generalmente un hermano), pero sólo parcialmente los antígenos menores, pues cierta alorreactividad puede ser beneficiosa, aunque demasiada es claramente perjudicial. Cuando el donante es un hermano o familiar se habla de trasplante alogénico relacionado y cuando el donante no es un familiar se

trata de trasplante alogénico no relacionado o no emparentado. La principal complicación (y limitación) de los xeno y alotrasplantes, además del rechazo y de la toxicidad asociada al régimen de acondicionamiento previo al trasplante, es precisamente la alorreactividad, que puede resultar en la denominada enfermedad del injerto contra el huésped (EICH), y que está originada por células T maduras del donante presentes en el injerto y que responderían frente a las células y tejidos del receptor, pudiendo llegar a causar la muerte de éste. Este tipo de trasplantes requieren regímenes de acondicionamiento mieloablativos e inmunosupresores, además de un tratamiento de inmunosupresión después del trasplante para prevenir o tratar la EICH.

El trasplante singénico es poco utilizado en la práctica, pero altamente seguro y eficaz cuando se trata de trasplantes de órganos sólidos. El donante y el receptor son gemelos univitelinos, por lo que no existen diferencias genéticas entre ellos anulando la posibilidad de rechazo y de EICH. Por ello, en el caso del sistema hematopoyético, el trasplante singénico sólo estaría indicado para el tratamiento de algunas enfermedades no malignas así como de enfermedades malignas cuando no existe un donante compatible para realizar un alotrasplante. En las hemopatías malignas, la ausencia de alorreactividad constituiría una desventaja por su falta de efecto antileucémico, aunque por otro lado aseguraría el trasplante de células libres de enfermedad.

Finalmente, el trasplante autólogo implica menos complicaciones relacionadas con el trasplante. Se utiliza casi exclusivamente en pacientes oncológicos tanto de tumores sólidos (para regenerar su sistema hematopoyético destruido por las altas dosis de quimioterapia y/o radioterapia), como de distintas hemopatías malignas. Este tipo de trasplante evita la EICH pero al carecer de alorreactividad se asocia a un mayor riesgo de recaída de la enfermedad.

En algunas enfermedades hereditarias, una alternativa al trasplante alogénico es la terapia génica en células hematopoyéticas autólogas. Las enfermedades monogénicas que afectan al sistema hematopoyético han sido y son las principales candidatas a ser tratadas con terapia génica. La corrección génica a nivel de CMH autólogas, que se realiza *ex vivo*, reduce enormemente la posibilidad de rechazo, aunque no se debe descartar la posibilidad de una respuesta inmune frente al producto del gen terapéutico. Este tipo de terapia es generalmente mucho menos tóxica y mejor tolerada que un alotrasplante. Algunas enfermedades en las que las células corregidas

tienen una ventaja selectiva respecto a las células deficientes (por ejemplo en la inmunodeficiencia severa combinada ligada al cromosoma X, SCID-X1) o bien no requieren acondicionamiento o bien permiten el uso de pautas de acondicionamiento menos tóxicas (por ejemplo con dosis subletales de busulfán).

2.2- Acondicionamiento en el trasplante de progenitores hematopoyéticos

El acondicionamiento es el tratamiento preparativo previo al trasplante. Tradicionalmente se ha considerado que en el trasplante alogénico el acondicionamiento persigue tres objetivos:

- Ablación o eliminación del clon o clones tumorales en hemopatías malignas.
- Inmunosupresión para evitar el rechazo del injerto.
- Eliminación de las células hematopoyéticas endógenas (mieloablación) para “crear espacio” en la MO y facilitar el injerto.

Para ello, clásicamente se han administrado dosis altas de irradiación corporal total (ICT) acompañadas o no de fármacos quimioterápicos. Actualmente se sustituyen, siempre que es posible e indicado para la enfermedad a tratar, las dosis altas de ICT por dosis altas de agentes mielosupresores como el melfalán o el busulfán combinados con inmunosupresores como la ciclofosfamida. Los regímenes de acondicionamiento han evolucionado a pautas mieloablativas e inmunosupresoras mejor toleradas por los pacientes, y de hecho en los últimos años ha aparecido una nueva modalidad de trasplante alogénico conocida como “minialo”, en la que se realiza un acondicionamiento de intensidad reducida, cuyo objetivo es producir una mieloablación parcial y la creación de un quimerismo mixto tras el trasplante. Posteriormente, la infusión de linfocitos T del donante conducirá a una situación de quimera completa. Estos trasplantes se asocian a una menor toxicidad, por lo que pueden ser aplicados a pacientes de edad relativamente avanzada que no resistirían un trasplante mieloablativo convencional.

En los trasplantes autólogos no hay ninguna necesidad de inmunosupresión con lo que los objetivos antes citados se reducen a dos. En el caso de la terapia génica hematopoyética el acondicionamiento tendría como único objetivo la creación de espacio en la MO, aunque este es un concepto controvertido. En realidad no está demasiado claro porqué es necesario depleccionar la MO. Hay autores que creen que es una cuestión de espacio: el nicho hematopoyético está ocupado por las CMH

endógenas, y las células trasplantadas no encontrarían espacio libre para anidar, o dicho de otra manera, el compartimiento de CMH estaría completo y no habría espacio para nuevas CMH. Otros autores piensan que es una cuestión de competencia: en realidad en la MO habría espacio disponible, pero al estar las células endógenas en mucho mayor número, las CMH trasplantadas lo tendrían muy difícil para competir con ellas por los nichos hematopoyéticos. En este sentido, se han descrito injertos hematopoyéticos en receptores no acondicionados trasplantándoles “megadosis” de células (Stewart et al. 1993; Bachar-Lustig et al. 1998; Rachamim et al. 1998). El tratamiento mieloablatoivo reduce el número de células endógenas, con lo que la competencia para las CMH trasplantadas es menor y las posibilidades de anidar en la MO del huésped también son mayores.

2.3- Tipos de quimerismo hematopoyético. Modelos experimentales para su estudio

Después de un TPH, el receptor genera células hematopoyéticas a partir de las CMH del donante, lo que da lugar a una situación de quimerismo. Un organismo quimérico es aquel que tiene poblaciones celulares derivadas de un individuo distinto, y por tanto con distinta dotación genética.

Cuando las células del donante injertan y reconstituyen por completo el sistema hematopoyético del receptor se habla de quimerismo o quimera completa, ya que la hematopoyesis del receptor ha sido totalmente eliminada por el acondicionamiento y por las células inmunes del donante. Si se reduce la dosis de acondicionamiento, las células endógenas no se llegan a eliminar por completo y se consiguen quimerismos o quimeras mixtas, en las que pueden convivir a lo largo de la vida del receptor células del donante con células del receptor.

Las quimeras mixtas se clasifican según el porcentaje de células que derivan del donante respecto a las del receptor. Así, hablaremos de macroquimerismos cuando el 1% o más de las células sanguíneas deriven del donante, y de microquimerismo cuando este porcentaje sea inferior al 1%. En la terapia génica hematopoyética, el injerto de células autólogas a las que se les ha introducido un transgén crearía lo que se denomina una quimera molecular. Las células trasplantadas son del propio individuo, pero el producto (generalmente una proteína) expresado por el transgén las diferencia del resto de células endógenas.

Para detectar y cuantificar el quimerismo (el nivel de injerto) en modelos animales de trasplante hematopoyético se han desarrollado diversas técnicas que incluyen el uso de marcadores citogenéticos, bioquímicos, inmunológicos y moleculares (Fig. 3). En este sentido, en el modelo murino, sin duda el más ampliamente utilizado, una posibilidad es el uso de donantes macho para trasplantar a receptores hembra. Mediante técnicas de hibridación *in situ*, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o *Southern Blot* es posible detectar secuencias específicas del cromosoma Y y cuantificar el nivel de quimerismo en las receptoras. Aunque se trate de un trasplante singénico, pueden darse respuestas inmunológicas frente a las proteínas codificadas en el cromosoma Y. Otras técnicas incluyen el uso de ratones transgénicos para la enzima β -galactosidasa o la proteína verde fluorescente (GFP). Los transgenes sirven como marcadores para diferenciar a las células derivadas del donante. El marcaje génico con retrovirus también se ha usado para evaluar el quimerismo, pero la eficiencia de transducción no es del 100%, hecho que limita la exactitud de la cuantificación del quimerismo.

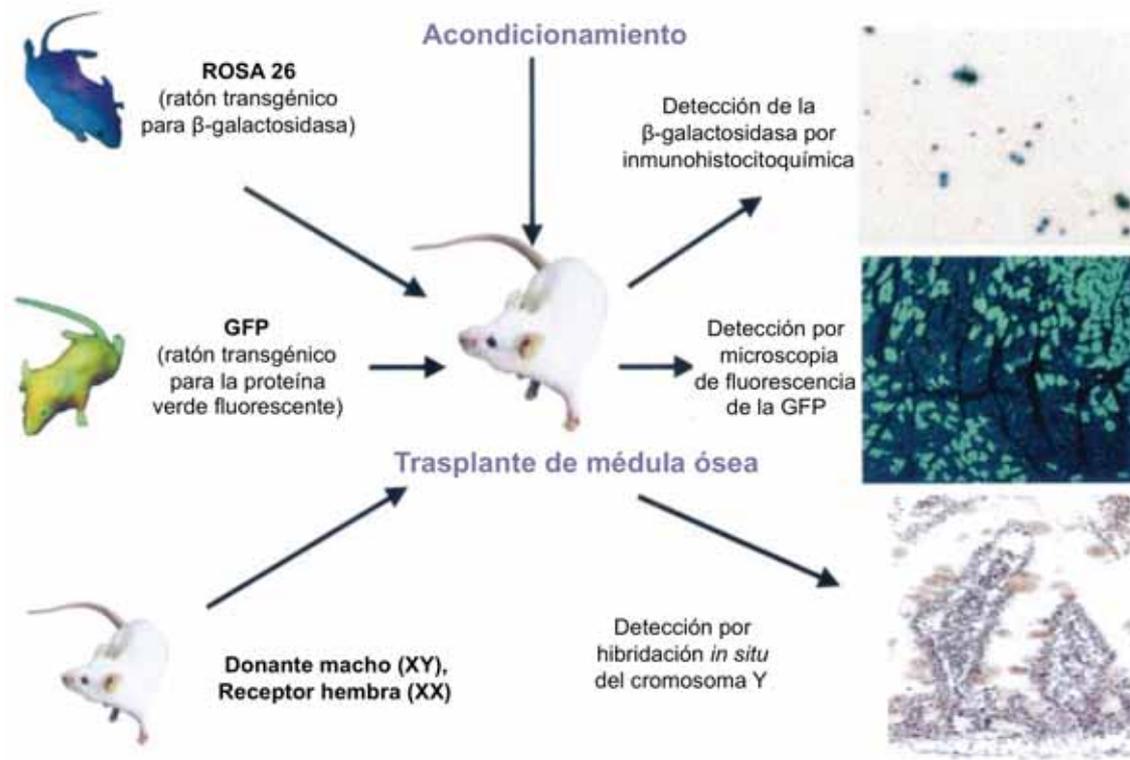


Fig. 3- Modelos animales de trasplante singénico. Técnicas bioquímicas, moleculares, microscópicas, citométricas y citogenéticas permiten evaluar el quimerismo en modelos singénicos de ratones.

El uso de cepas de ratones que se diferencian genéticamente entre ellas por una sola diferencia alélica está muy extendida entre los grupos que trabajan con trasplantes hematopoyéticos. En este caso hablamos de cepas congénicas y de trasplante congénico. En algunos casos estas diferencias antigénicas permiten distinguir y cuantificar las células derivadas del donante de las células endógenas mediante marcaje con anticuerpos monoclonales. En este sentido, uno de los modelos más utilizados es el que emplea las cepas congénicas C57BL/6J y B6.SJL-*Ptprc^aPep3^b*/BoyJ, que se diferencian entre ellas por el antígeno de membrana CD45; los primeros tienen la isoforma CD45.2 y los segundos la CD45.1 (Fig. 4). El marcador de membrana CD45 es un antígeno panleucocitario, o lo que es lo mismo, se encuentra en todas las células de estirpe hematopoyética excepto en los eritrocitos. Aunque no es tan inmunogénico como las proteínas derivadas del cromosoma Y, se han publicado estudios que apoyarían la inducción de respuestas inmunes débiles frente al antígeno CD45.1 en receptores CD45.2 tras el trasplante y viceversa (van Os et al. 2001; Xu et al. 2004).

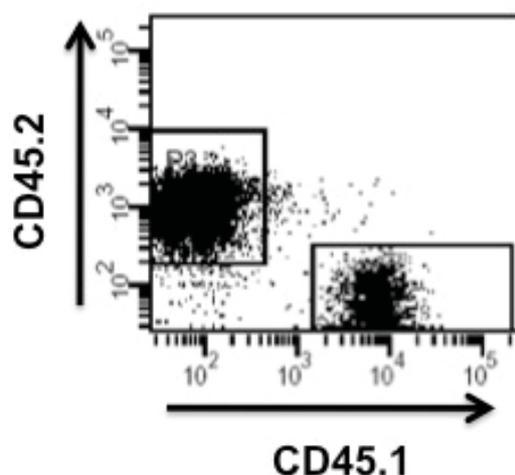


Fig. 4- Detección de los marcadores CD45.1 y CD45.2 por citometría de flujo. Mediante el marcaje con anticuerpos monoclonales conjugados a distintos fluorocromos, se distinguen por citometría de flujo aquellas células que derivan del donante (CD45.1) de las células endógenas (CD45.2), pudiendo cuantificar el porcentaje de quimerismo de forma rápida y precisa.

3- TERAPIA GÉNICA HEMATOPOYÉTICA

Se conoce como terapia génica el conjunto de técnicas o estrategias que permiten la introducción de genes o secuencias de ácidos nucleicos exógenos en células o tejidos diana con una finalidad terapéutica. En los años 80 se desarrollaron las primeras líneas celulares empaquetadoras de vectores virales recombinantes que permitieron

generar dichos vectores a concentraciones elevadas y se realizaron los primeros estudios de transferencia génica en animales (Williams et al. 1984; Kwok et al. 1986; Yu et al. 1986; Kantoff et al. 1987). La década de los 90 vivió un “boom” de ensayos clínicos de terapia génica, y desde entonces esta joven disciplina no ha parado de evolucionar. Hoy las técnicas de transferencia génica se aplican en múltiples campos, ya sea como herramienta de estudio, por ejemplo para el marcaje celular con proteínas fluorescentes y la generación de animales transgénicos, o como herramienta terapéutica para tratar enfermedades hereditarias (algunas de ellas ya son curables mediante esta forma de terapia) o adquiridas (principalmente cáncer).

La terapia génica en células somáticas puede efectuarse tanto *in vivo* como *ex vivo*, dependiendo de la vía de entrada del transgén en el tejido afectado, del tipo de vector utilizado y del tejido diana. La terapia génica *in vivo* implica la administración del vector que contiene el transgén directamente al tejido diana (por ejemplo al hígado en el caso de la hemofilia, al músculo en el caso de la distrofia muscular o de la misma hemofilia), o bien directamente a la circulación sanguínea. Un grave riesgo de la terapia génica *in vivo*, dado que no se puede controlar a qué tejido irá el vector, es la posibilidad de transducir la línea germinal, con lo que podría modificarse el patrimonio genético de la especie. Cuando por el contrario las células se extraen del individuo y se transducen fuera del organismo hablamos de terapia génica *ex vivo*. Este es el caso de la terapia génica hematopoyética.

3.1- Mecanismos de transferencia génica

La terapia génica se basa en una gran variedad de formas de transferencia de genes. La elección de una u otra depende del tipo de célula o tejido diana, de la eficiencia requerida y de la estabilidad deseada de la expresión del transgén en la célula diana.

Para ello se han desarrollado técnicas que van desde los métodos físico-químicos (transfección) hasta la utilización de vectores virales (transducción). Los métodos físicos comprenden técnicas tales como la electroporación, la microinyección y el *gene gun* o cañón de genes. Los métodos químicos más comúnmente usados son la precipitación del ADN con sales de fosfato cálcico, los liposomas y la endocitosis mediada por receptores, entre otras. En general, este grupo de técnicas está destinado a aplicaciones que no requieran una expresión estable del transgén en las células diana.

Cuando se requiere más eficiencia y/o estabilidad, como ocurre en la mayoría de aplicaciones de terapia génica, hay que recurrir a los vectores virales, mucho más útiles debido a que se aprovechan de la alta infectividad y eficiencia de los virus, unos organismos que a lo largo de la evolución se han especializado precisamente en la introducción de su material genético en células huésped para poderse replicar y subsistir. Los vectores virales se pueden clasificar en dos grandes grupos: los no integrativos y los integrativos. Los adenovirus son los vectores no integrativos más usados, sobretodo en protocolos clínicos para tratar diferentes tipos de cáncer. En estos casos no siempre interesa una expresión sostenida en el tiempo del transgén, sino que se persiguen efectos transitorios (por ejemplo por la acción de genes suicidas o la inducción de una respuesta inmune antitumoral). En el caso de las enfermedades genéticas hereditarias se persigue justo lo contrario. En este caso se busca la expresión de la proteína terapéutica a lo largo de la vida del individuo, por lo que el uso de vectores virales integrativos con el fin de expresar transgenes a largo plazo en el tejido diana es más adecuado. Los principales vectores virales integrativos son los basados en los virus de la familia *Retroviridae*, que incluyen siete grandes géneros (Tabla 1), dos de los cuales se usan ampliamente en terapia génica: los lentivirus y los gamma-retrovirus, pero también existen vectores basados en los espumavirus. Aunque estrictamente hablando los espumavirus y los lentivirus también son retrovirus, este término se aplica comúnmente a los vectores basados en los gamma-retrovirus (antiguamente denominados oncoretrovirus, ya que los cinco primeros géneros fueron clasificados como tales en el pasado), por lo que en este trabajo se referirá a los vectores basados en los gamma-retrovirus como vectores retrovirales para diferenciarlos del resto de vectores.

Tabla 1- Familia *Retroviridae*

Género	Especies representativas	Genoma
Alfa-retrovirus	Virus del Sarcoma de Rous (RSV)	Simple
	Virus de la Leucemia Aviar (VLA)	
Beta-retrovirus	Virus del Tumor Mamario de Ratón (MMTV)	Simple
Gamma-retrovirus	Virus de la Leucemia Murina de Moloney (MoMuLV)	Simple
Delta-retrovirus	Virus de la Leucemia Bovina (BLV)	Complejo
	Virus de la Leucemia T Humana (HTLV-I/II)	
Epsilon-retrovirus	Virus del Sarcoma Dérmico de Walleye (WDSV)	Simple
Lentivirus	Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo I (HIV-I)	Complejo
Espumavirus	Espumavirus Humano	Complejo

Los virus de la familia *Retroviridae* se clasifican en siete géneros, además de poderlos clasificar en dos categorías según la complejidad de su genoma.

Los primeros vectores virales integrativos que se desarrollaron fueron los basados en el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV) y, de hecho, son con mucho los que más se han utilizado en protocolos clínicos de terapia génica para enfermedades hereditarias.

3.2- Vectores retrovirales

3.2.1- Características, estructura y componentes de los retrovirus

Los retrovirus son virus ARN de cadena sencilla con envuelta de aproximadamente 80-120 nm de diámetro. Se clasifican en dos grupos según la complejidad de su genoma (Tabla 1): simples y complejos. Los retrovirus simples contienen únicamente la información genética elemental y común a todos los retrovirus (Fig. 5a), mientras que los complejos codifican además para proteínas reguladoras adicionales.

El genoma de los retrovirus está compuesto por dos cadenas sencillas de ARN que forman un dímero mediante puentes de hidrógeno y tienen un tamaño variable de 8-12 Kb. Concretamente, el genoma del MoMuLV tiene un tamaño aproximado de 9,7 Kb. La región codificante común a todos los retrovirus contiene tres genes, ordenados de 5' a 3':

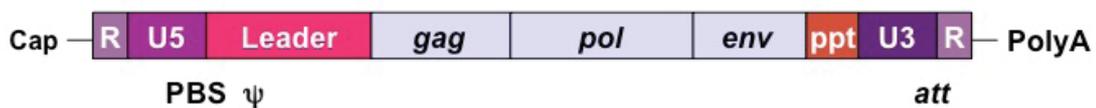
- *gag* codifica para proteínas estructurales internas no glicosiladas: proteínas de la cápside (CA), proteínas de la matriz (MA) y proteínas de la nucleocápside (NC).
- *pol* codifica para las enzimas necesarias para la replicación viral: transcriptasa reversa (RT), integrasa (IN), proteasa (PR).
- *env* codifica para las glicoproteínas de la envuelta, que le confieren el tropismo al virus, es decir, determinan el tipo celular y la especie que el virus puede infectar: glicoproteína de superficie (SU) y glicoproteína transmembranal (TM).

Asimismo el genoma retroviral contiene una serie de regiones no codificantes comunes a todos los retrovirus (de 5' a 3'):

- Región Cap: ribonucleótido metilado unido al primer nucleótido del ARN viral. Está implicada en la traducción.
- Región R: secuencia corta (15-250 nucleótidos) que contiene una cola de poliadenilación y que se encuentra repetida en ambos extremos del genoma retroviral.
- Región U5: región formada por 70-250 bases.

- Sitio de unión del iniciador (*Primer Binding Site* o PBS): es el sitio de unión al tARN que permite el inicio de la transcripción reversa, formado por 18 bases complementarias al extremo 3' del tARN iniciador.
- Señal de empaquetamiento o encapsidación (ψ , *psi*): secuencia que forma una estructura secundaria imprescindible para que las moléculas de ARN genómico de nueva síntesis sean reconocidas por las cápsides de nueva formación y las empaqueten o encapsiden para formar nuevos viriones.
- Región *Leader*: en esta región de 90 a 500 nucleótidos se encuentran secuencias de reconocimiento y unión a factores de transcripción esenciales para la expresión del genoma viral.
- Región de polipurinas (*polypurine tract*, *ppt*): región corta (7-18 bases) rica en purinas (A/G) responsable del inicio de la síntesis de la cadena positiva durante la retrotranscripción. Es la primera región que se encuentra a 3' de la región codificante del genoma retroviral.
- Región U3: formada por 200-1200 bases, contiene elementos promotores y el sitio *att*, imprescindible para la integración del provirus en el genoma de la célula huésped.

a)



b)

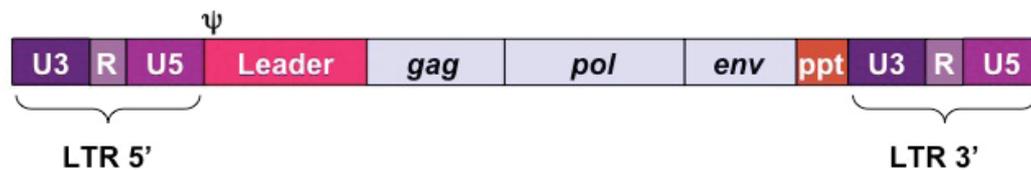


Fig. 5- Esquema del genoma retroviral simple. a) Ilustración del ARN genómico retroviral con sus componentes básicos. b) Esquema general del ADN viral una vez se ha retrotranscrito en el citoplasma de la célula huésped (provirus).

ψ : señal de empaquetamiento; *att*: sitio de integración; LTR: secuencias repetitivas largas de los extremos; PBS: *primer binding site*; PolyA: secuencia de poliadenilación.

La envuelta retroviral deriva de la membrana de la célula huésped (es por tanto una bicapa lipídica) en la que se encuentran insertadas las glicoproteínas de la envuelta,

codificadas por el gen *env*, y que le confieren la especificidad de infección (tropismo) al virus. La subunidad transmembranal y la subunidad de superficie están unidas entre sí por puentes disulfuro. Las proteínas que componen la matriz envuelven a la cápside que a su vez contiene en su interior las proteínas que forman la nucleocápside (nucleoproteínas unidas al ARN viral), así como las diferentes proteínas necesarias para el ciclo vital del virus: RT, PR e IN, todas ellas codificadas por el gen *pol* (Fig. 6).

El ciclo vital del retrovirus empieza por el reconocimiento y unión específica a los receptores de la célula que va a infectar. Una vez el virus ha sido internalizado por fusión de las membranas viral y celular, la cápside viral se desestructura liberando el genoma y las proteínas virales al citoplasma celular. Es entonces cuando el ARN viral se retrotranscribe a ADN de doble cadena por acción de la RT, dando lugar al provirus (Fig. 5b). El proceso de transcripción inversa genera las secuencias largas repetitivas de los extremos (LTR), regiones de unos 300-1800 pares de bases formados por las regiones 5'- U3-R-U5 -3' que se encuentran a ambos extremos del genoma viral. Contienen regiones promotoras y activadoras esenciales para la expresión de los genes virales en la célula huésped, además de secuencias importantes para la integración.

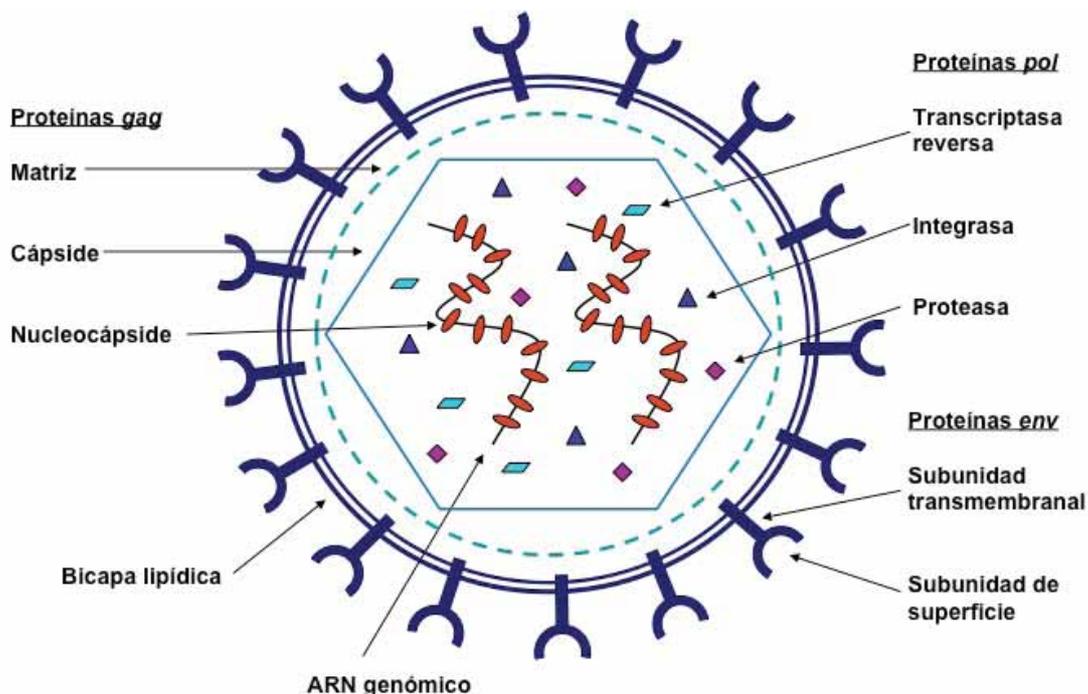


Fig. 6 – Esquema general de un retrovirus y sus componentes. Los retrovirus son virus ARN con envuelta. Las proteínas codificadas por el gen *gag* forman parte de la estructura del virus; las proteínas codificadas por el gen *pol* son las enzimas necesarias para la transcripción inversa y la integración del genoma viral en la célula huésped, y la glicoproteína de la membrana, que confiere el tropismo al virus, está codificada por el gen *env*.

El complejo de preintegración (PIC) se forma por la unión de proteínas citoplasmáticas al ADN de doble cadena viral y es transportado al núcleo para que el ADN viral (provirus) se pueda integrar en el genoma de la célula huésped. En el caso de los gamma-retrovirus, el complejo PIC es de tamaño relativamente grande y no es capaz de atravesar la membrana nuclear intacta, requiriendo que la célula esté en fase de mitosis (cuando la membrana nuclear está desestructurada) para poder integrarse en el genoma de la célula infectada. Ésta es una gran diferencia con los lentivirus, los cuales sí pueden infectar células quiescentes ya que su complejo PIC, de menor tamaño y mayor nucleofilia, puede ser importado a través de la membrana nuclear. Una vez el provirus se ha integrado en el genoma celular, éste se sirve de la maquinaria transcripcional de la célula para transcribir moléculas de ARN virales con dos destinos distintos: unos son traducidos para dar lugar a las proteínas necesarias para formar nuevos viriones (proteínas estructurales: SU, TM, MA, CA, NC y proteínas enzimáticas: RT, PR, IN) y otros son empaquetados para generar nuevos viriones. Las glicoproteínas de la envuelta de nueva síntesis se expresan en la membrana celular, lugar donde los componentes virales se ensamblan y los ARN de nueva síntesis son empaquetados. Los viriones de nueva formación son extruídos (proceso denominado *budding*) de la célula llevándose con ellos una parte de la membrana celular, que contiene en su superficie la glicoproteína de la envuelta. En la Figura 7 se esquematiza el ciclo vital del retrovirus. El proceso de extrusión no lisa a la célula huésped, de manera que toda la progenie de ésta llevará integrado el provirus, que se replicará junto al material genético de las células huésped.

3.2.2- Producción de vectores retrovirales recombinantes

La mayoría de vectores retrovirales están basados en el genoma del gamma-retrovirus MoMuLV. Al genoma del virus salvaje se le sustituyen los genes virales por uno o varios genes de interés. Conservan las regiones no codificantes, incluyendo la señal de empaquetamiento, y a veces también se sustituye la región promotora del retrovirus por un promotor de interés. De esta manera, los vectores se integran en el genoma de la célula huésped pero son incapaces de generar las proteínas virales necesarias para generar nuevas partículas virales al carecer de los genes víricos necesarios para tal fin.

La producción de vectores retrovirales recombinantes se realiza en líneas celulares que expresan, de forma estable o transitoria, los genes virales necesarios para la producción de vectores retrovirales recombinantes.

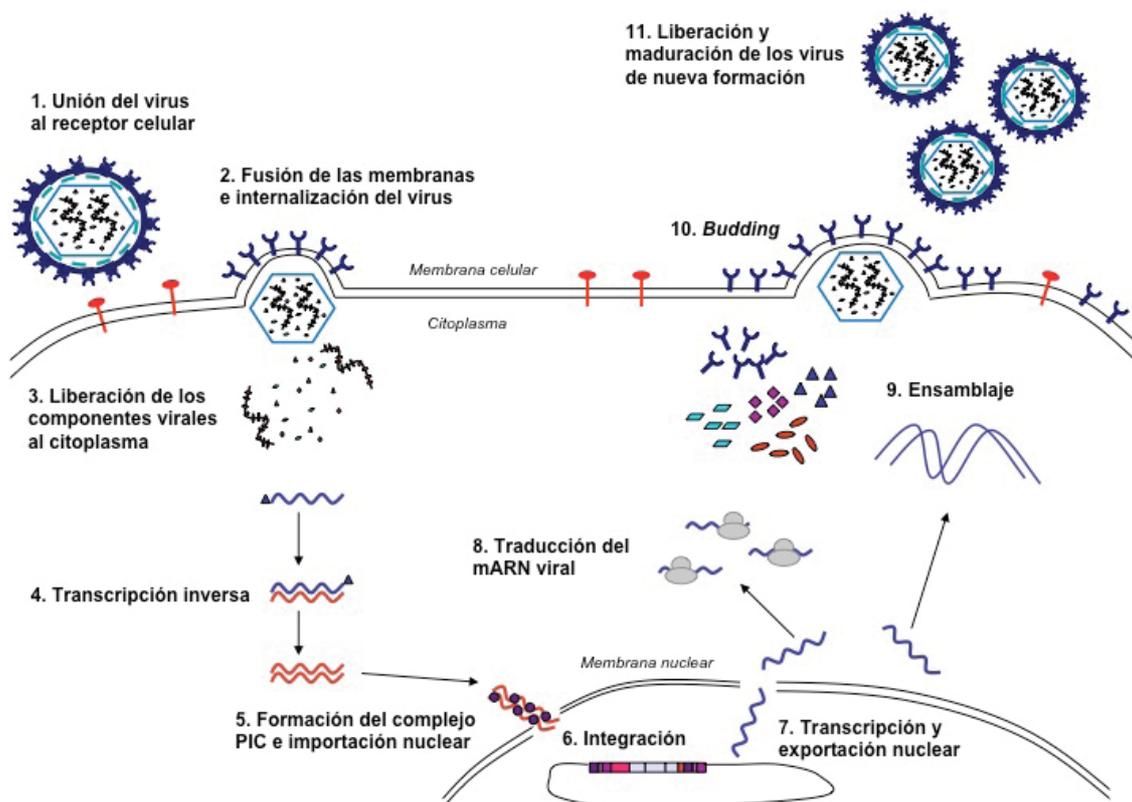


Fig. 7- Esquema del ciclo vital de los retrovirus. Ver texto.

La producción de estos vectores se realiza en líneas celulares que expresan, de forma estable o transitoria, los genes virales necesarios para la formación de nuevos viriones separados en dos plásmidos; uno contiene los genes *gag* y *pol* y el segundo el gen *env*, los tres genes básicos de los retrovirus. Carecen, por lo tanto, de las regiones no codificantes. Con estos elementos las células empaquetadoras sólo producen cápsides virales vacías al no reconocer ningún ARN, ya que no contienen la secuencia de empaquetamiento (Fig. 8). Cuando se introduce el vector retroviral con el gen o genes de interés en las células empaquetadoras, las proteínas estructurales virales reconocen la secuencia de empaquetamiento en el transcrito derivado del vector retroviral y lo empaquetan en los viriones de nueva formación. Estas células se denominan entonces células productoras de vectores (Fig. 8). Una vez introducidos, el gen o genes de interés se expresan a lo largo de la vida de la célula y pasan a su progenie al contener el vector integrado en su genoma, produciendo además la proteína codificada por el transgén.

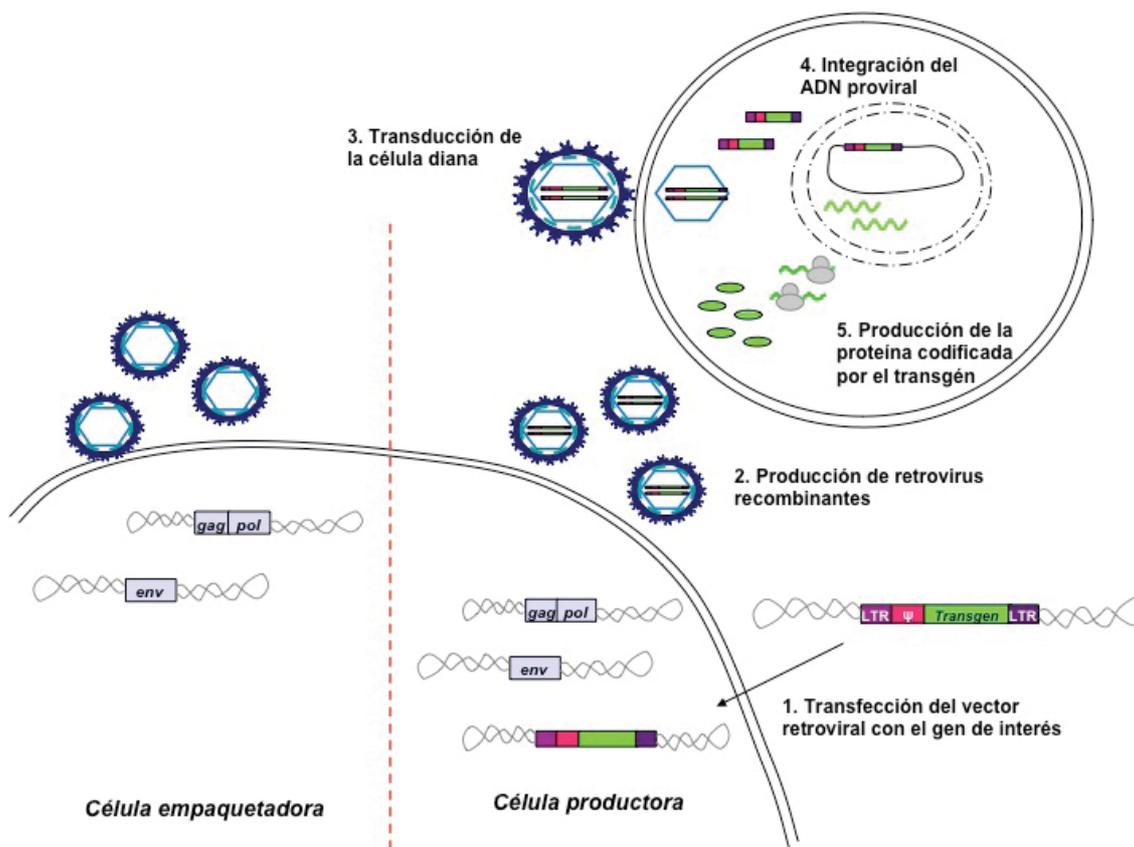


Fig. 8- Células empaquetadoras y productoras. Esquema de las células empaquetadoras (panel izquierdo), de las células productoras (panel derecho) y de la transferencia del transgén de interés a la célula diana.

3.2.3- Seudotipado de los retrovirus recombinantes: tipos de envueltas

Un paso importante en la mejora de la terapia génica con vectores retrovirales fue el pseudotipado, proceso que consiste en el uso de diferentes glicoproteínas de la envuelta para cambiar el tropismo del vector o para que éste pueda infectar células diana de una forma más óptima.

En la Tabla 2 se resumen las glicoproteínas de la envuelta más usadas hasta el momento. La mayoría de ellas reconocen específicamente receptores presentes en la membrana de la célula diana, excepto la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), que se fusiona con la membrana de la célula huésped sin reconocimiento específico de receptor (Yee et al. 1994). Los primeros vectores retrovirales que se desarrollaron para transducir CMH humanas contenían la envuelta anfotrópica propia del MoMuLV. Más adelante ésta se sustituyó por la envuelta del virus de la leucemia del gibón (GALV) (Kiem et al. 1997), que resultó ser mucho más

eficiente para transducir CMH humanas (van Hennik et al. 1998; Barquinero et al. 2000). Este hecho se atribuye a que estas células tienen una expresión más elevada del receptor Pit-1, reconocido específicamente por la envuelta GALV, que del receptor anfotrópico Pit-2. Asimismo, la envuelta más usada por su elevada eficiencia para transducir células hematopoyéticas murinas con vectores retrovirales es la envuelta ecotrópica.

Tabla 2 – Proteínas de la envuelta más usadas para pseudotipar

	Procedencia	Receptor	Función del Receptor	Tropismo
Anfotrópico	Glicoproteína gp 70 del virus de la MoMuLV (cepa anfotrópica)	Pit-2	Canal de fosfato	Primates, perro, gato, gallina, roedores
Ecotrópico	Glicoproteína gp 70 del virus de la MoMuLV (cepa ecotrópica)	CAT-1	Transportador de aminoácidos catiónicos	Ratón y rata
GALV	Glicoproteína gp70 del virus de la leucemia del gibón	Pit-1	Canal de fosfato	Primates, perros y rata
RD114	Proteína de la envuelta del virus endógeno felino	RDR	Transportador de aminoácidos neutros	Primates, perro y gato
10A1	Glicoproteína gp70 del clon 10A1 del virus de la MoMuLV	Pit-1 Pit-2	Canales de fosfato	Primates, perro, gato, rata, ratón
VSV-G	Glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular	Fosfolípidos de membrana	Componentes de la membrana celular	Ubicuo

3.3- La EGFP como gen marcador

A lo largo de la historia de la terapia génica se ha usado el marcaje génico con diferentes finalidades, entre las que se encuentran las siguientes:

- Cuantificar las células que expresan el vector.
- Seleccionar las células que expresan el vector tanto *in vivo* como *in vitro* (Persons et al. 1997).
- Optimizar protocolos de transducción *in vitro* e *in vivo*.
- Optimizar protocolos de trasplante de CMH (Bodine et al. 1991).
- Estudiar el comportamiento y la contribución de diferentes poblaciones celulares *in vivo* (por ejemplo, estudio de la contribución a la recaída de células de MO autólogas trasplantadas después de un tratamiento de quimioterapia en

- pacientes con cáncer) (Brenner et al. 1993; Brenner and Rill 1994; Deisseroth et al. 1994).
- Estudiar la capacidad de repoblación a largo y corto plazo después de un trasplante de MO (Persons et al. 1998).
 - *Cell tracking*, seguimiento *in vivo* de células marcadas tras el trasplante (Persons et al. 1998).
 - Estudios de inmunogenicidad de transgenes.

Existen diferentes tipos de genes marcadores. Los primeros que se usaron fueron los genes que confieren resistencia a antibióticos o quimioterápicos (neo, mdr-1, etc), pero su detección y la selección de las células que expresan estos genes es larga y tediosa, aunque algunos de ellos permiten una selección eficiente *in vivo* de las células transducidas (Sorrentino et al. 1992). También se han usado genes que codifican para enzimas como la β -galactosidasa, la fosfatasa alcalina y la luciferasa o marcadores de superficie fácilmente detectables mediante marcaje inmunológico o inmunohistoquímico, como es el caso del receptor del factor de crecimiento nervioso (NGFR) (Mavilio et al. 1994), el antígeno murino de superficie CD24 (Pawliuk et al. 1994) o el antígeno humano HSA (*heat stable antigen*) (Conneally et al. 1996). Pero el marcaje génico experimenta un gran avance con la aparición de la GFP de la medusa *Aequorea victoria*, que aporta una serie de ventajas respecto al resto de marcadores antes citados. El gen de la GFP se clonó en 1992 (Chalfie et al. 1994), y da lugar a una proteína de 238 aminoácidos. Unos años más tarde se desarrolló una variante de la GFP, la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP), que contiene dos mutaciones en la zona del cromóforo (P64L y S65T), entre otras modificaciones y emite una fluorescencia más intensa respecto a la proteína original cuando es excitada a 488 nm (Cormack et al. 1996). La EGFP y las proteínas fluorescentes en general presentan evidentes ventajas respecto al resto de marcadores génicos, ya que pueden ser visualizadas de forma directa al microscopio de fluorescencia y ser detectadas sin previa manipulación de las células por citometría de flujo (Fig. 9), lo que implica que las células que las expresan se pueden separar fácilmente y en poco tiempo de aquellas que no las expresan. Por estas razones, desde su aparición han sido ampliamente usadas en estudios de transferencia génica desplazando al resto de sistemas de marcaje génico. Los descubridores de la GFP han recibido el Premio Nobel de Química este año 2008.

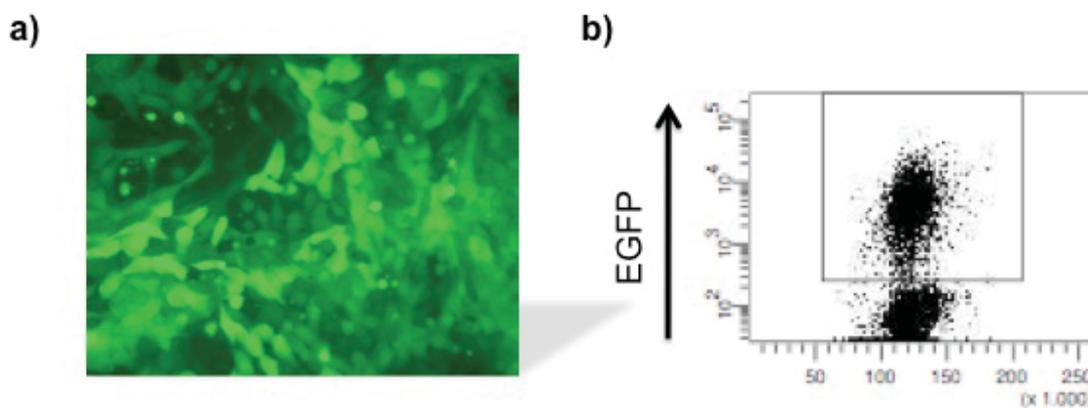


Fig. 9- Ejemplo de la detección de la fluorescencia emitida por la EGFP. a) Imagen obtenida al microscopio de fluorescencia (x40) de una línea celular fibroblástica de ratón que expresa la EGFP. b) Análisis por citometría de flujo de una línea celular de timoma murino. Se distinguen dos poblaciones: las células en la parte inferior no expresan la EGFP y las de la parte superior sí la expresan, aunque a diferentes intensidades.

3.4- Protocolos clínicos de terapia génica con vectores retrovirales en el sistema hematopoyético

Las CMH, junto con las células madre epiteliales, son los compartimientos *stem* celulares que reúnen mejores características para su utilización como células diana en terapia génica, ya que se conoce sobradamente su capacidad de autorrenovación (pudiéndose automantener a lo largo de la vida del individuo), se obtienen con relativa facilidad, tienen la capacidad de sobrevivir en cultivos *ex vivo* y se pueden manipular y trasplantar fácilmente. Son especialmente adecuadas para la corrección de defectos genéticos que afectan al sistema hematopoyético.

Los transgenes introducidos en las CMH se pueden expresar a lo largo de la vida del individuo en los diferentes linajes hematopoyéticos, pudiendo además evitar el desarrollo de una respuesta inmune contra el transgén por la creación de tolerancia específica frente a éste, salvando así uno de los grandes problemas de la terapia génica: la potencial inmunogenicidad de los transgenes. Este último aspecto hace único al sistema hematopoyético como diana terapéutica, ya que ningún otro tejido, quizás con excepción del hígado, tiene la capacidad *per se* de crear tolerancia. Por ello, es concebible el uso de terapias génicas basadas en el sistema hematopoyético con el único objetivo de inducir tolerancia en situaciones como la autoinmunidad, el trasplante o las terapias génicas no hematopoyéticas (Bracy et al. 1998; Yang et al. 1998; Ierino et al. 1999; Alderuccio et al. 2006; Tian et al. 2007).

La primera enfermedad genética tratada mediante terapia génica fue la inmunodeficiencia combinada severa por deficiencia de la enzima adenosina desaminasa (ADA-SCID) (Blaese et al. 1993; Blaese et al. 1995; Bordignon et al. 1995; Kohn et al. 1995). Sin embargo, no fue hasta el año 2000 cuando se reportó el primer gran éxito de la terapia génica por el grupo francés de Marina Cavazzana-Calvo y Alain Fischer (Cavazzana-Calvo et al. 2000). La enfermedad genética tratada fue la SCID-X1, en la que la mutación de la cadena gamma común (γ_c) de diferentes receptores de citocinas bloquea la diferenciación de los linfocitos T y de las células NK. Mediante un vector retroviral se introdujo una versión funcional del gen γ_c en células CD34⁺ de los propios pacientes, que fueron reinfundidas sin previo acondicionamiento. En este momento se han tratado con relativo éxito casi una veintena de pacientes en Francia y en el Reino Unido (Hacein-Bey-Abina et al. 2002; Gaspar et al. 2004).

El segundo gran éxito de la terapia génica para enfermedades génicas fue publicado por un grupo italiano en el año 2002 (Aiuti et al. 2002) nuevamente en niños con ADA-SCID. Al contrario que en el anterior ensayo clínico llevado a cabo en los años 90, los pacientes recibieron un acondicionamiento previo al trasplante de las células autólogas corregidas genéticamente y se les eliminó progresivamente la terapia sustitutiva con PEG-ADA. Además de las mejoras en el campo de la terapia génica (mejores vectores, seudotipaje de los vectores, condiciones de cultivo de las CMH mejoradas y consecuente aumento de la eficiencia de transducción), los autores postulan que la continua administración de la PEG-ADA habría anulado la potencial ventaja selectiva de las células corregidas sobre las enfermas, que seguirían muriendo por apoptosis al no poder eliminar los metabolitos tóxicos por ser deficientes en ADA.

3.5- Terapia génica y seguridad

Los vectores virales integrativos tienen el riesgo asociado de oncogénesis por inserción, ya sea por activación o sobreexpresión de oncogenes o por inactivación de genes supresores de tumores. Esta posibilidad se consideraba altamente improbable ya que ningún estudio en modelos preclínicos había reportado este hecho, pero tres años después del tratamiento con terapia génica para la SCID-X1 se publicaron los primeros casos de leucemia en dos pacientes tratados por el grupo francés (Hacein-Bey-Abina et al. 2003b). El análisis genético de las células malignas mostraba en ambos casos la inserción del vector retroviral cerca de la región reguladora de un

protooncogén denominado *LMO-2*, asociado a leucemias infantiles. Hasta ahora 4 pacientes del protocolo francés y uno en el inglés han desarrollado leucemia, habiendo fallecido uno de ellos. Aunque la mutagénesis insercional es un problema que hay que solventar y en el que muchos grupos están investigando, no se debe olvidar que el tipo de transgén, el tipo de vector retroviral usado, el tropismo del virus, el protocolo de transducción (principalmente la cantidad de citocinas, el medio usado y la relación del número de virus por célula), la dosis celular administrada al paciente, el lugar de inserción del vector, la edad de los pacientes y la propia predisposición de éstos a desarrollar leucemias son factores que, por ellos mismos o sinérgicamente, podrían dar lugar a procesos malignos después de un tratamiento con terapia génica. Otro aspecto de la seguridad en protocolos de terapia génica es la potencial inmunogenicidad de los transgenes. Que un transgén desencadene una respuesta inmune o no, depende de múltiples factores, entre los que se encuentran la vía de administración, el tejido diana, el vector usado, la dosis del transgén y la naturaleza del propio transgén, así como probablemente de factores individuales (factores genéticos como el MHC, repertorio linfocitario, exposiciones previas a antígenos, etc) que determinan una mayor o menor susceptibilidad.

4- TOLERANCIA INMUNOLÓGICA

La tolerancia inmunológica se define como la ausencia de respuesta por parte del sistema inmunitario frente a un antígeno específico, ya sea propio o extraño.

La tolerancia a antígenos extraños es importante para evitar respuestas inmunes a los alimentos que ingerimos o a las partículas que inhalamos diariamente. Cuando esta tolerancia se ve alterada para determinados antígenos, el individuo sufre procesos alérgicos al entrar en contacto con éstos. Por otro lado, la tolerancia a los antígenos propios es de vital importancia ya que este mecanismo evita que el sistema inmune responda frente a antígenos propios, desencadene una respuesta inmunológica frente a éstos y produzca enfermedad. La tolerancia inmunológica frente a los antígenos propios se adquiere muy precozmente, con el desarrollo de sistema inmune. Ya en los años 50 Peter Medawar demostró elegantemente que el quimerismo alogénico inducido neonatalmente se asociaba a tolerancia específica frente a los tejidos del donante (Billingham et al. 1953) (Fig. 10).

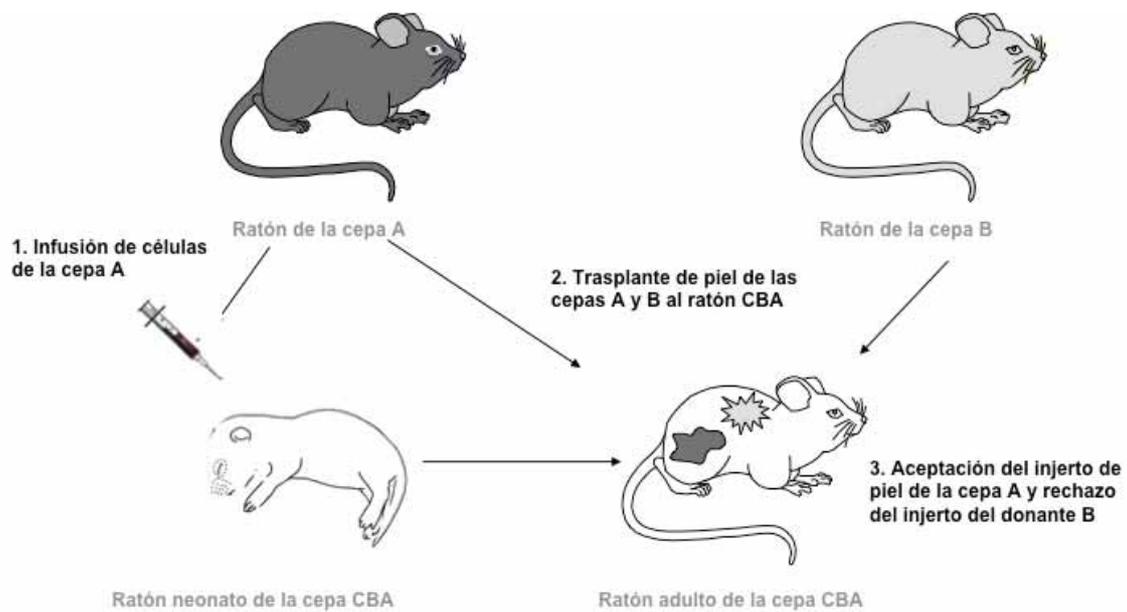


Fig. 10- Esquema del experimento realizado por Medawar y colaboradores. Se inyectaron células de la cepa A de ratón a ratones neonatos de la cepa CBA. Cuando éstos alcanzaron la edad adulta, recibieron injertos de piel de las cepas alogénicas A y B. El injerto de piel de la cepa B fue rechazado, mientras que el de la cepa A fue tolerado por los receptores.

4.1- La presentación de antígenos

Las células presentan antígenos en su superficie con el fin que éstos sean reconocidos específicamente por el receptor de la célula T (TCR). Este es un proceso propio de la inmunidad celular adaptativa, ya que la inmunidad innata se caracteriza por ser un tipo de respuesta no específica.

Los antígenos pueden ser lipopolisacáridos, lipoproteínas, glicolípidos o proteínas. Los linfocitos T específicos para un antígeno no lo reconocen en su forma soluble, sino que reconocen péptidos antigénicos de éste unidos a las moléculas del MHC, que son las encargadas de mostrar o presentar péptidos antigénicos a los linfocitos T. El MHC es una región de genes polimórficos cuyos productos se expresan en la superficie de diferentes tipos celulares. Las moléculas del MHC de tipo I (MHC-I) se expresan en la superficie de la mayoría de células, presentan péptidos endógenos y activan a los linfocitos T $CD8^+$. La expresión de las moléculas del MHC de tipo II (MHC-II) está restringida a células presentadoras de antígeno (APC), básicamente células dendríticas (DC), linfocitos B y macrófagos, que presentan péptidos exógenos y activan a los linfocitos T $CD4^+$. Así, dependiendo del origen del antígeno éstos siguen distintas vías de presentación; los antígenos intracelulares o endógenos se presentan

por la vía de clase I y los antígenos extracelulares o exógenos son procesados y presentados por la vía de clase II.

4.1.1- Antígenos endógenos (intracelulares): vía de clase I

Los antígenos presentados por la vía de clase I son generalmente antígenos de patógenos intracelulares como los virus o proteínas aberrantes en el caso de células cancerosas. Las moléculas del MHC-I son heterodímeros formados por dos cadenas polipeptídicas. La cadena pesada o cadena α tiene un tamaño de 47 kD en ratón, y la cadena β o β 2-microglobulina, que no está codificada en la región MHC, tiene un tamaño de 12 kD. Las moléculas del MHC-I son las encargadas de unir a los antígenos endógenos y presentarlos en la superficie de la célula. Las proteínas son degradadas en el citoplasma celular por el proteasoma en pequeños péptidos de 8 a 11 aminoácidos y éstos son transportados al lumen del retículo endoplasmático por las proteínas del transportador asociado al procesamiento de antígenos (TAP). Allí el péptido antigénico se ensambla con las dos subunidades del MHC-I (sintetizadas en el retículo endoplasmático rugoso); la molécula del MHC-I cargada con el péptido antigénico es transportada hasta la membrana celular para presentar el antígeno en la superficie de la célula (Fig. 11). A través de su receptor (TCR), las células T CD8⁺ reconocen específicamente al complejo MHC-I/antígeno y, con las señales coestimuladoras pertinentes, se activan desencadenándose la denominada respuesta T citotóxica que resulta en la lisis de la célula que está presentando el antígeno.

4.1.2- Antígenos exógenos (extracelulares): vía de clase II

Mediante la llamada vía de clase II, los antígenos exógenos o extracelulares son presentados por moléculas del MHC-II. Generalmente los antígenos exógenos provienen de patógenos (bacterias o parásitos) y toxinas entre otros. Los patógenos o toxinas son endocitados por las APC en los tejidos periféricos. A diferencia de las moléculas del MHC-I que se expresan en prácticamente todas las células del organismo, las del MHC-II sólo se expresan en las APC, ya sea espontáneamente (DC, linfocitos B) o inducida por interferón- γ (IFN- γ) (macrófagos). El endosoma se acidifica, activando a proteasas que degradan a las proteínas en pequeños péptidos. A diferencia de las moléculas del MHC-I, las moléculas del MHC-II se unen a péptidos más grandes, entre 12 y 34 aminoácidos, aunque el tamaño preferido por la mayoría de moléculas de clase II es de 12 a 17 aminoácidos.

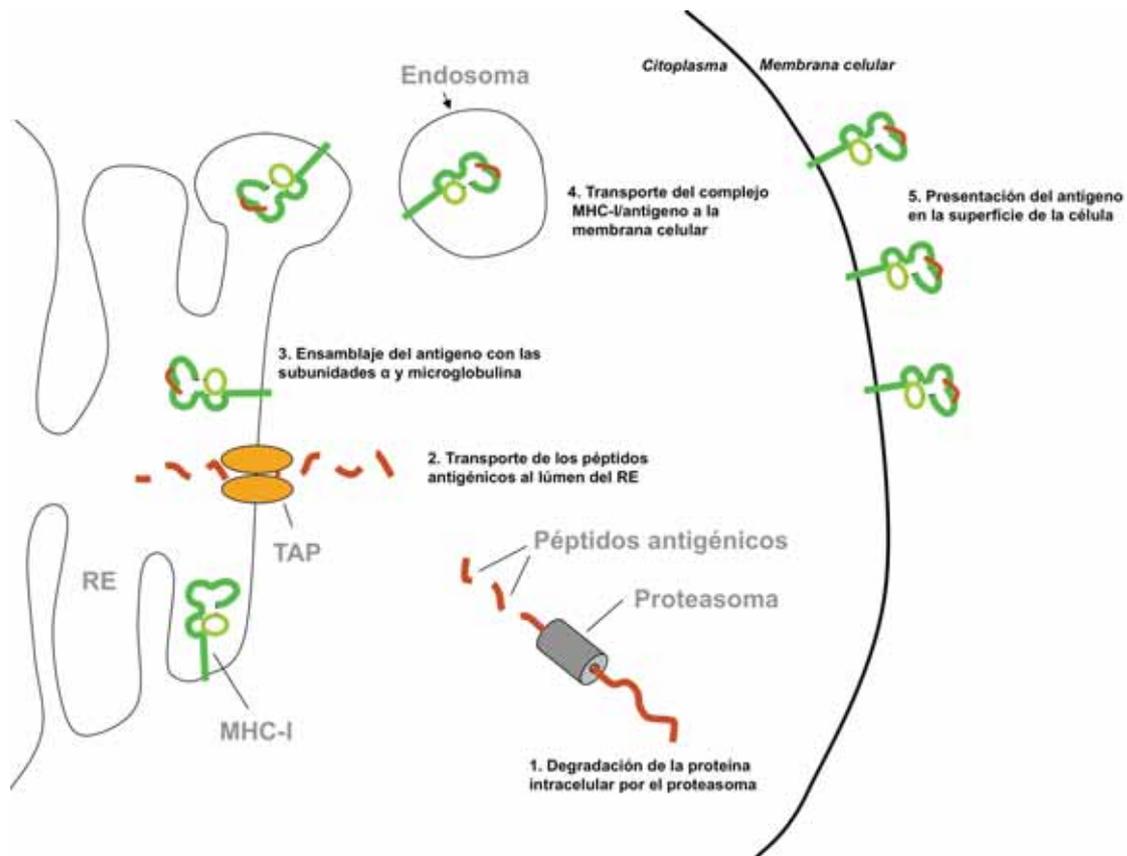


Fig. 11- Presentación de antígenos intracelulares por la vía de clase I. Una vez la proteína ha sido degradada por el proteasoma, los péptidos antigénicos entran en el lumen del retículo endoplasmático ayudados por el complejo proteico TAP. Allí, si encuentran alguna molécula del MHC-I con la afinidad adecuada se unen a ella. Finalmente el complejo MHC-I/antígeno es transportado a la superficie de la célula.

MHC-I: molécula del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I; RE: retículo endoplasmático; TAP: transportador asociado al procesamiento de antígenos.

Por otro lado, la molécula del MHC-II, formada por dos cadenas polipeptídicas polimórficas (cadena α y cadena β), se sintetiza y ensambla en el retículo endoplasmático. Al dímero $\alpha\beta$ se le une al mismo tiempo una proteína denominada cadena invariante (Ii o CD74). La Ii es una proteína integral de membrana celular que contiene tres dominios: en la Ii murina, el dominio N-terminal es corto, de 30 aminoácidos, la región transmembranal la forman 24 aminoácidos y el dominio intraluminal, el más largo, lo componen 150 aminoácidos. Tres dímeros $\alpha\beta$ se unen secuencialmente a un trímero de Ii para posteriormente abandonar el retículo endoplasmático. Tras pasar por el *trans* Golgi, el complejo $(\alpha\beta Ii)_3$ es transportado al compartimento endocítico. Las vesículas que contienen los péptidos antigénicos resultantes de la proteólisis y las vesículas que contienen a las moléculas del MHC-II finalmente se fusionan (Cresswell 1994). A diferencia de las moléculas del MHC-I, las del MHC-II son transportadas al compartimento endocítico sin un antígeno cargado.

La Ii, además de dirigir el transporte de las moléculas del MHC-II al endosoma (la señal de localización endocítica está situada en el dominio citoplasmático de la Ii), tiene como función evitar la unión prematura o aberrante de antígenos ya degradados a la hendidura del MHC-II. En el compartimiento endocítico, la Ii es paulatinamente degradada por unas proteasas denominadas catepsinas, hasta que sólo queda un pequeño fragmento unido a la hendidura de la molécula del MHC-II. Este pequeño fragmento, denominado CLIP (péptido asociado a la cadena invariante de las moléculas de histocompatibilidad de clase II), se libera finalmente de la hendidura del MHC-II por interacción con el dímero $\alpha\beta$ HLA-DM (en humanos) o H2-M (en ratón), dejando libre la hendidura del MHC-II para que se le puedan unir los péptidos antigénicos y se presenten en la superficie de la célula (Neeffjes et al. 1990; Roche and Cresswell 1991) (Fig. 12). Estas características de la Ii han hecho que haya sido utilizada para dirigir secuencias de interés (p.e. que codifiquen para péptidos antigénicos) hacia el compartimiento de clase II, garantizando una presentación eficiente por dicha vía de presentación de antígenos (Carstens et al. 2000; Bischof et al. 2001). Las células T CD4⁺ reconocen específicamente el complejo MHC-II/péptido antigénico, pero sólo se activan si además se dan las señales de coestimulación pertinentes.

Las células T CD4⁺ se denominan también linfocitos T colaboradores (*T helper*, Th), ya que una vez activados secretan diferentes citocinas, que a su vez activan a otros tipos celulares. Según el tipo de estímulo recibido se pueden generar o activar cuatro subpoblaciones distintas de células T: Th1, Th2, Th17 y T reguladoras. La secreción de interleucina-12 (IL-12) estimula la activación de las células Th1. Éstas están implicadas en la inmunidad celular, mientras que las células Th2, estimuladas por la IL-4, son esenciales en la inmunidad humoral mediada por los linfocitos B. La subpoblación Th17, descrita recientemente (Aggarwal et al. 2003; Langrish et al. 2005), debe su nombre a la IL-17, citocina efectora de este subtipo celular (Rouvier et al. 1993; Yao et al. 1995). Es una subpoblación que se cree que está implicada en procesos inflamatorios y a la que se le atribuye un papel importante en diversas enfermedades alérgicas y autoinmunes (Matusevicius et al. 1999; Barczyk et al. 2003; Cua et al. 2003; Fujino et al. 2003; Murphy et al. 2003; Witowski et al. 2004; Langrish et al. 2005). Finalmente, las células T reguladoras inhiben la respuesta tanto humoral como celular mediada por el resto de células efectoras del sistema inmune.

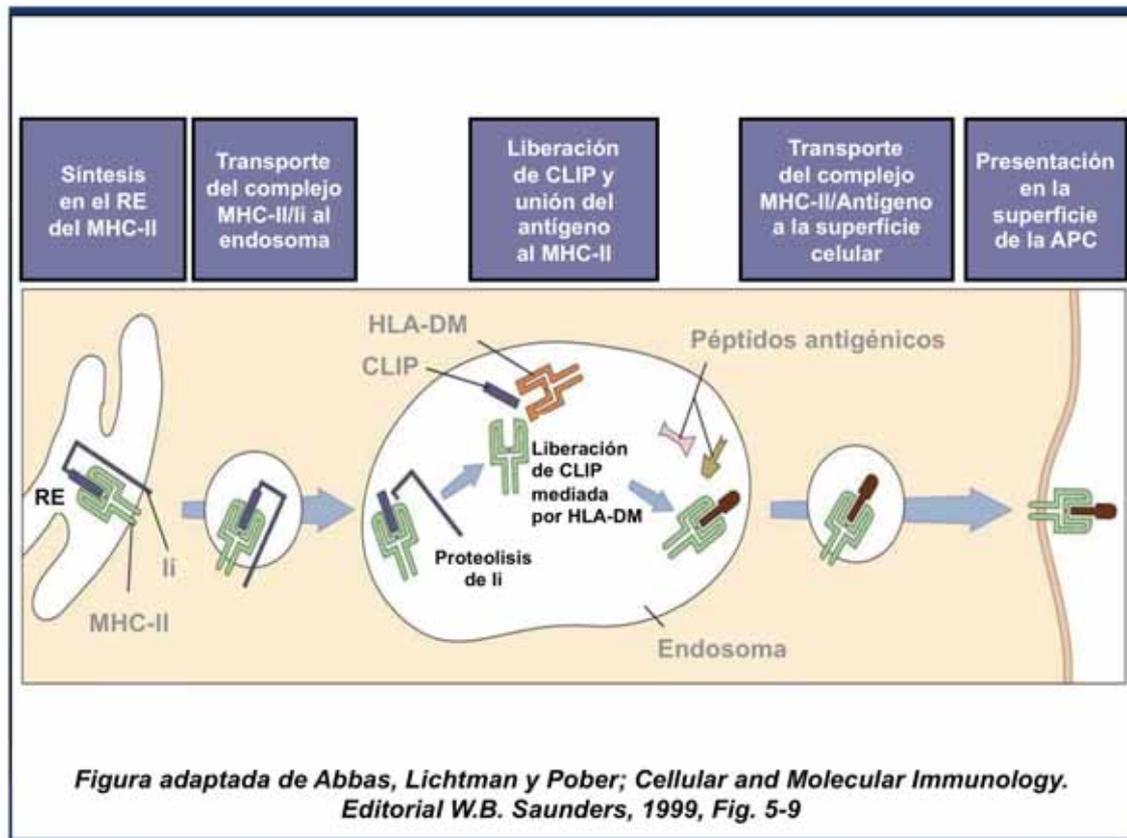


Fig. 12- Presentación de antígenos extracelulares por la vía de clase II.

CLIP: péptido asociado a la cadena invariante de las moléculas de histocompatibilidad de clase II; II: cadena invariante; MHC-II: molécula del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II; RE: retículo endoplasmático.

4.2- Mecanismos de tolerancia T

4.2.1- Tolerancia central

Las células T inmaduras generadas en la MO (denominadas células o linfocitos preT) migran al timo para llevar a cabo su maduración. Primeramente se reordenan los genes del TCR, para generar el repertorio de clones T propio de cada individuo. Los linfocitos preT o timocitos adquieren dos correceptores, CD4 y CD8, formando inicialmente una población doble positiva ($CD4^+$ y $CD8^+$). En el proceso de maduración, el 90%-95% de los linfocitos preT que han migrado desde la MO mueren debido al reordenamiento génico aberrante del TCR o a los procesos de selección positiva y selección negativa a los que se ven sometidos en su proceso de maduración en el timo.

Una vez adquiridos el CD4, el CD8 y el TCR, aquellos linfocitos capaces de reconocer y unirse a los complejos formados por las moléculas del MHC (de clase I o de clase II)

propias cargadas con antígenos en el epitelio cortical tímico son seleccionados para sobrevivir, mientras que los linfocitos incapaces de reconocer a los complejos MHC propio/antígeno, mueren por apoptosis al no recibir las señales de supervivencia adecuadas. Los linfocitos seleccionados para sobrevivir dejan de expresar uno de los correceptores y se comprometen a uno de los dos linajes: linfocitos CD8⁺ (citotóxicos) o linfocitos CD4⁺ (colaboradores). Este proceso se denomina selección positiva, y asegura que las células T reconozcan a las moléculas del MHC propias, pero el proceso no discrimina a los timocitos autorreactivos. La selección negativa, que se cree que se da a continuación de la selección positiva aunque no existen pruebas de ello, implica la delección clonal de aquellos timocitos capaces de reconocer y unirse a complejos formados por el MHC y antígenos propios. Aunque en principio la selección negativa tiene lugar tanto en el córtex como en la médula tímica, es esta última la que parece estar especializada en este proceso. En la selección negativa están implicadas células medulares del timo, tanto las de estirpe hematopoyética (macrófagos, DC y células B) como las epiteliales (Kyewski and Klein 2006). Los timocitos que interactúan con una alta avidéz, debida en gran medida a una unión de alta afinidad del TCR con el complejo MHC/antígeno propio, reciben señales de apoptosis resultando en la muerte de la célula (Allen 1994; Alam et al. 1996). Contrariamente, los linfocitos inmaduros con baja afinidad por estos complejos pueden sobrevivir a la selección negativa, por lo que deben existir otros mecanismos de tolerancia en la periferia para controlar a los clones potencialmente autorreactivos que escapan de la selección negativa tímica. Recientemente se han identificado en los órganos linfoides periféricos células que presentan autoantígenos que no se presentarían en el timo y que tienen la capacidad de deleccionar a linfocitos T *naïve* autorreactivos (Gardner et al. 2008).

Aunque la delección clonal es el principal mecanismo de tolerancia central, la presentación de antígenos por parte de las células epiteliales del timo también promueve el desarrollo de células T reguladoras específicas (Itoh et al. 1999; Baldwin et al. 2004), que en la periferia inmunomodulan a otras células inmunes inhibiendo su capacidad efectora.

4.2.2- Tolerancia periférica

Como se ha comentado en el apartado anterior, las células T autorreactivas que escapan de la tolerancia central en el timo están reguladas por diferentes mecanismos

periféricos de tolerancia: la ignorancia clonal, la anergia, la delección clonal (por apoptosis) y la supresión (Fig. 13).

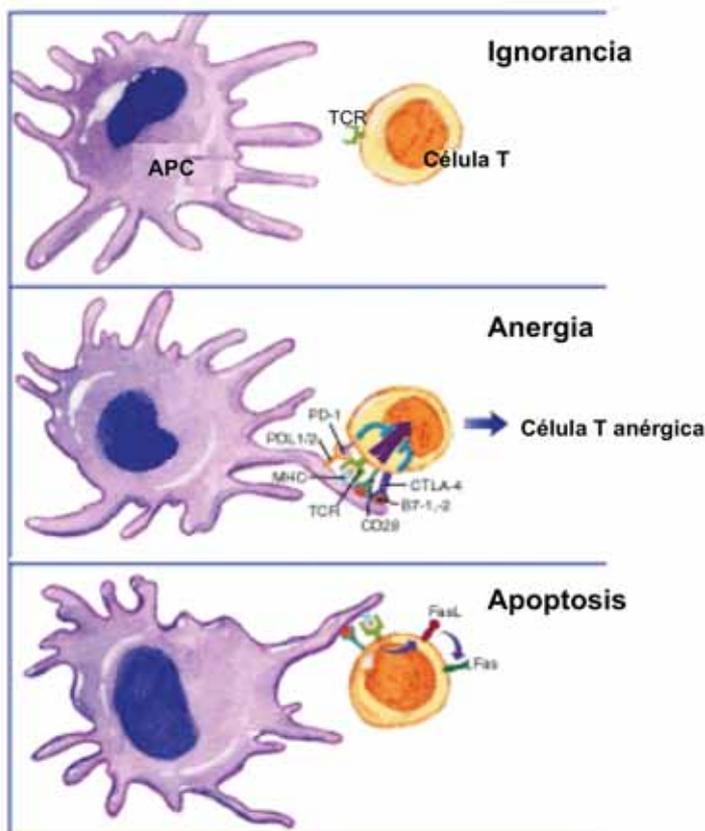


Fig. 13- Mecanismos de tolerancia T periférica. La ignorancia, anergia y apoptosis son tres de los mecanismos por los cuales el organismo mantiene la tolerancia de aquellas células T autorreactivas que han escapado de la tolerancia central en el timo.

Figura adaptada de Walker, L.S.K. & A.K. Abbas (2002) Nat. Rev. Immunol. 2:11.

APC: célula presentadora de antígeno; TCR: receptor de la célula T.

La ignorancia clonal es una forma de tolerancia pasiva que se puede dar en diferentes contextos (Arnold et al. 1993). La existencia de una barrera física hace imposible el encuentro entre la célula efectora y la célula que presenta el antígeno propio, que generalmente no es una APC. La célula T puede hallarse en el mismo tejido que un antígeno propio pero si las células del tejido en cuestión no expresan moléculas del MHC, lo hacen a un nivel insuficiente para activar a la célula T autorreactiva o el número de células T autorreactivas es insuficiente no se desencadena una respuesta inmune manteniéndose el estado de tolerancia.

La anergia es un proceso que se da cuando el linfocito se activa de forma incompleta, es decir, que reconoce el complejo MHC/antígeno (primera señal), pero no recibe la segunda señal coestimuladora necesaria para activarse (Appleman and Boussiotis

2003). Las células T también pueden entrar en anergia si reconocen a antígenos por los que tienen poca afinidad (Alam et al. 1996). La vía coestimuladora más estudiada es la mediada por la interacción de la molécula CD28 de la célula T con las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 (B7.1 y B7.2) expresadas en la superficie de la APC. La expresión en la superficie del linfocito del receptor CTLA-4 y la unión de éste a las moléculas CD80/CD86 en lugar de a CD28, conduce a la célula a un estado anérgico (Wells et al. 2001).

Además de la delección a nivel tímico, los linfocitos T también pueden ser deleccionados en la periferia por la expresión de moléculas como CTLA-4 o Fas y su ligando (Fas-ligando), que promueven la apoptosis de la célula T. También se ha descrito como mecanismo de delección a nivel periférico la exposición a altas concentraciones de antígeno (Ferber et al. 1994).

La supresión es un mecanismo que lleva a cabo activamente la subpoblación de células T reguladoras naturales (Treg) y que generalmente requiere del contacto célula-célula. Las Treg se diferencian del resto de subtipos T por la expresión simultánea de los marcadores CD4, CD25 y del factor de transcripción FoxP3, que juega un papel crucial en la diferenciación de estas células. Las Treg también se denominan células T reguladoras naturales ya que se generan en el timo (Baldwin et al. 2004), aunque se ha descrito que también se pueden generar células Treg en la periferia a partir de células T CD4⁺ *naïve* (O'Garra and Vieira 2004). Las Treg generadas o inducidas en órganos periféricos adquieren capacidad de supresión de la respuesta T por estimulación antigénica en la periferia (O'Garra and Vieira 2004), momento en el que expresan los mismos marcadores que las Treg generadas en el timo (CD4, CD25 y FoxP3). Diferentes autores han descrito que la activación de las Treg es antígeno específica, aunque el mecanismo final de supresión es independiente de antígeno (Thornton and Shevach 2000; Karim et al. 2005). Existe otra subpoblación de células reguladoras que se induce por exposición crónica a antígenos en presencia de IL-10, citocina con actividad antiinflamatoria e inmunosupresora. Las células T reguladoras de tipo 1 (Tr1), tal y como se denomina a esta subpoblación reguladora, a diferencia de las Treg antes mencionadas no expresan marcadores específicos. Se han caracterizado por su patrón de expresión de citocinas; producen gran cantidad de IL-10, IL-5 y factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), bajos niveles de IL-2 (citocina implicada en la proliferación de los linfocitos) y no producen IL-4, aunque su principal e invariable rasgo es la elevada producción de IL-10 (Roncarolo et al. 2006).

4.3- Tolerancia B

Las células B se generan y desarrollan en la MO. La selección clonal a nivel central en la población de células B inmaduras se da por unión de éstas a antígenos propios presentes en la membrana de células tanto hematopoyéticas como de otras estirpes.

El proceso de tolerización central de las células B es mucho menos estricto que el que sufren las células T, por ello muchas células B escapan a la tolerancia central y migran a la periferia, donde el mecanismo de tolerancia más importante es la anergia (Goodnow 1992). La propia tolerancia de las células Th mantiene a las células B en estado de anergia en la periferia. Además, igual que ocurre en el compartimiento linfóide T, las células B pueden entrar en anergia al unirse a antígenos en condiciones de no coestimulación (por ejemplo en ausencia de señales de peligro) o por la expresión de moléculas pro apoptóticas.

4.4- Pérdida de tolerancia: las enfermedades autoinmunes

A pesar de la existencia de los mecanismos de tolerancia central y periférica que mantienen al sistema inmune controlado para que no reaccione frente a antígenos propios, éstos pueden fallar. Cuando se rompe la tolerancia inmune aparecen enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, la diabetes tipo I o la esclerosis múltiple (EM) entre otras.

La pérdida de tolerancia puede darse por diferentes circunstancias. Se ha demostrado que el nivel de expresión de los autoantígenos en el timo es un factor importante a la hora de desarrollar tolerancia frente a éstos (Liston et al. 2005; Taubert et al. 2007). A nivel periférico, procesos como el daño tisular permiten que células autorreactivas entren en contacto con el antígeno pudiendo desencadenar una respuesta inmune. El daño tisular puede causar que antígenos antes inaccesibles queden expuestos. Por otro lado, los superantígenos, generalmente de origen bacteriano, son capaces de activar a un gran número de clones de linfocitos T o B, activando de forma inespecífica a linfocitos autorreactivos que permanecían en estado de ignorancia o anergia en la periferia. A veces, un linfocito autorreactivo puede reconocer a un antígeno derivado de un patógeno por el parecido estructural con un antígeno propio (mimetismo molecular) y desencadenar una respuesta frente a éste, lo que podría originar una enfermedad autoinmune.

4.5- Quimerismo hematopoyético y tolerancia

Aunque se asume que la expresión de transgenes en el sistema hematopoyético induce tolerancia frente a estos, en la literatura se encuentran datos contradictorios en este respecto. Evans y colaboradores consiguieron prevenir la respuesta tanto humoral como celular en ratones deficientes en el factor VIII de la coagulación (FVIII), a los que trasplantaron con células de MO transducidas con un vector retroviral que contenía una versión funcional del FVIII humano (Evans and Morgan 1998). Asimismo, después del trasplante de células de MO transducidas con vectores retrovirales conteniendo la GFP como gen marcador en distintos modelos animales irradiados letal o subletalmente, se mantiene la expresión sostenida del transgén en todos los casos (Goerner et al. 2001; Puig et al. 2002). La creación de quimerismo molecular se ha establecido como una excelente herramienta para inducir tolerancia específica frente a antígenos. Se han realizado estudios de injerto de piel para demostrar la capacidad tolerogénica del establecimiento de quimerismos moleculares, ya sea usando acondicionamientos mieloablativos (Bagley et al. 2002b) o no mieloablativos (parcialmente mielosupresivos) (Andersson et al. 2003b). Contrariamente, otros trabajos reportan el rechazo de las células de MO transducidas con diferentes transgenes (proteínas fluorescentes o proteínas terapéuticas) en distintos modelos animales, sobretodo en grandes animales (Lutzko et al. 1999; Morris et al. 2004).

5- LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La EM es una enfermedad crónica, inflamatoria y desmielinizante del sistema nervioso central (SNC). Es la principal causa de discapacidad en adultos jóvenes, después de los traumatismos. La EM se diagnostica mayoritariamente en adultos de entre 20 y 40 años, siendo mayor su frecuencia en mujeres que en hombres (relación 2:1).

La EM es una enfermedad heterogénea en la que se diferencian tres subgrupos clínicos principales. La mayoría de los pacientes desarrollan una forma remitente-recurrente (EM RR). A consecuencia de la aparición de nuevos procesos inflamatorios, la enfermedad se desarrolla en forma de brotes de empeoramiento clínico que remiten total o parcialmente. Aproximadamente el 50% de los pacientes con EM RR desarrollan a lo largo del tiempo una forma progresiva de la enfermedad, denominada secundariamente progresiva (EM SP). Finalmente, en un 10-15% de los pacientes la enfermedad evoluciona de forma progresiva desde su inicio (forma primariamente progresiva o EM PP), sin remisión de la sintomatología.

La EM es una enfermedad mediada por el sistema inmune. Las responsables de desencadenar la respuesta inmune son las células T CD4⁺ específicas frente a antígenos de la vaina de mielina, aunque participan muchas otras poblaciones de células inmunes en la patogenia de la enfermedad. Aunque la causa de la EM es aún desconocida, se hipotetiza que la predisposición genética y diversos factores ambientales podrían estar implicados en la pérdida de la tolerancia y el inicio de la respuesta autoinmune. Tampoco se conoce con exactitud cuales son los antígenos de la mielina contra los que va dirigida la respuesta inmune. La vaina de mielina es una estructura proteolipídica que recubre los axones con el fin de acelerar la transmisión del impulso nervioso. Está compuesta por una fracción lipídica (que constituye el 75% de ésta) y una fracción proteica (25%). Al tratarse de una estructura compleja, contiene numerosos autoantígenos que podrían potencialmente ser diana de la respuesta autoinmune en la EM. Las principales dianas antigénicas candidatas son la proteína mielínica básica (MBP), la proteína proteolipídica (PLP) y la glicoproteína mielínica de los oligodendrocitos (MOG). Los principales antígenos candidatos se han utilizado para desarrollar el modelo animal de la EM, la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE).

6- LA ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL

La EAE es una enfermedad experimental autoinmune y desmielinizante del SNC que comparte características clínicas, patogénicas e histopatológicas con la EM, por lo que se considera el modelo animal que mejor reproduce la enfermedad humana (Lassmann and Wisniewski 1979; Wekerle et al. 1994).

6.1- Inducción de la EAE

La EAE se induce experimentalmente en especies susceptibles tales como roedores, lagomorfos y primates, ya sea mediante una inmunización activa o por transferencia pasiva. En la inmunización activa se inyectan subcutáneamente (s.c.) o intradérmicamente una suspensión de homogeneizado de SNC, mielina, proteínas de la mielina, péptidos o antígenos mielínicos autólogos o heterólogos emulsificados en adyuvantes (Paterson 1960). En la transferencia pasiva se inyectan intravenosamente (i.v.) células T específicas frente a antígenos de la mielina, procedentes del bazo o de los ganglios linfáticos de animales inmunizados activamente, lo que demuestra la

implicación del sistema inmune en la patogenia de la enfermedad (Pettinelli and McFarlin 1981; Mokhtarian et al. 1984; van der Veen et al. 1989; Sun et al. 2001).

6.1.1- Susceptibilidad

No todas las especies animales ni todas las cepas son susceptibles a la inducción de la EAE. Estas diferencias en la susceptibilidad suelen ser atribuidas a la dotación genética de la cepa y a los polimorfismos existentes en los antígenos del MHC-II y del TCR principalmente (Zamvil and Steinman 1990; Dahlman et al. 1999; Roth et al. 1999).

6.1.2- Antígenos

En los primeros modelos se utilizó un homogeneizado de SNC para inducir activamente la enfermedad (Kabat et al. 1946; Kabat et al. 1947; Kabat et al. 1949). Con la evolución de las técnicas de purificación de proteínas se empezaron a usar proteínas purificadas, principalmente la MBP, la PLP y la MOG (Gardinier et al. 1992), aunque más recientemente se ha descrito la inducción de la EAE con otras proteínas relacionadas con la mielina como la proteína mielínica básica asociada a los oligodendrocitos (MOBP) (Maatta et al. 1998; Holz et al. 2000; Kaye et al. 2000), la glicoproteína asociada a la mielina (MAG) (Weerth et al. 1999; Morris-Downes et al. 2002), la glicoproteína específica de los oligodendrocitos (OSP) (Stevens et al. 1999; Zhong et al. 2000; Morris-Downes et al. 2002) y la 2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa (CNPasa) (Maatta et al. 1998; Morris-Downes et al. 2002), presente en los oligodendrocitos. Actualmente se utilizan tanto las proteínas citadas en este apartado como diversos péptidos encefalitogénicos derivados de ellas. El uso de péptidos ha permitido una mayor reproducibilidad de los distintos modelos de EAE y el desarrollo de la enfermedad en especies o cepas que son resistentes a la inmunización con las proteínas completas pero susceptibles a la inmunización con determinados péptidos de las mismas.

En resumen, la EAE es el resultado de la inmunización de una especie o cepa susceptible con un antígeno encefalitogénico determinado. Las múltiples combinaciones de especies y antígenos dan lugar a una gran variedad de modelos diferentes de EAE.

6.2- Curso clínico

Después de la inmunización ya sea activa o pasiva, se desencadena la respuesta inmune específica frente al antígeno que da lugar a la aparición de una parálisis ascendente que empieza en la cola provocando paresia parcial o total de ésta (flacidez) y se extiende causando paraparesia o paraplejía de los miembros posteriores, pudiendo llegar hasta un grado de tetraparesia o tetraplejía que en ocasiones puede llegar a causar la muerte del animal (Fig. 14).

Existen diferentes cursos clínicos de la EAE dependiendo de la combinación de especie, cepa y antígeno encefalitogénico. Inmunizando ratas Lewis y DA con la proteína MBP o péptidos encefalitogénicos derivados de ella, se desarrolla un tipo de EAE aguda, que cursa con un único episodio clínico de enfermedad (Stepaniak et al. 1997; Lenz et al. 1999).

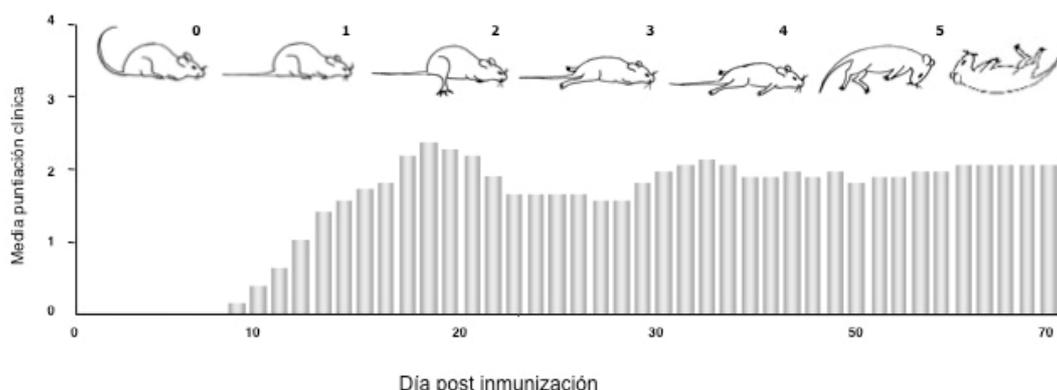


Fig. 14- Patrón evolutivo de los signos neurológicos en ratones C57BL/6J inmunizados con el péptido 40-55 de la MOG. El gráfico representa la puntuación clínica que se da a los diferentes grados de parálisis respecto al día después de la inmunización. La puntuación clínica va desde la ausencia de signos clínicos (puntuación = 0) pasando por la paraplejía de los miembros posteriores (puntuación = 3) hasta la muerte del ratón a causa de la enfermedad (puntuación = 6).

En la EAE remitente-recurrente se observan dos o más brotes clínicos. Este modelo se consigue inmunizando ratones SJL (aunque también se ha descrito en ratas) con la proteína PLP o péptidos encefalitogénicos derivados de ella (Polman et al. 1988). El tercer y último tipo de curso clínico es la EAE no remitente, en la cual los animales desarrollan un curso clínico progresivo (Fig. 14). Éste se observa en ratones con dotación genética H-2^b (generalmente C57BL/6J) y en ratas inmunizando con la

proteína MOG o péptidos derivados de ella (Mendel et al. 1995; Weissert et al. 1998) y en ratones con dotación genética H-2^u inmunizados con MBP (Acha-Orbea et al. 1988; Wraith et al. 1989).

6.3- Histopatología

En el SNC de los animales con EAE se observan infiltrados inflamatorios perivasculares y parenquimatosos constituidos principalmente por linfocitos y macrófagos que han atravesado la barrera hematoencefálica (BHE) (Lassmann et al. 1980; Polman et al. 1986; Pender 1987). En función de la especie, de la cepa y del antígeno usado para la inducción de la enfermedad, la inflamación puede ir acompañada de áreas de desmielinización. El modelo agudo de EAE en rata Lewis inmunizada con MBP se caracteriza por la ausencia de estas áreas de desmielinización, que sí se observan en los modelos remitente-recurrente y no remitente (ratones SJL inmunizados con PLP y C57BL/6J inmunizados con MOG respectivamente). En este último modelo es en el que se observa una desmielinización más extensa.

En la EAE, al igual que en la enfermedad humana, se observa daño y pérdida axonal (Raine et al. 1984; Raine and Cross 1989; Kornek et al. 2000) y se cree que es la principal causa de la discapacidad permanente (Wujek et al. 2002). Se ha descrito también que la formación de edema podría ser una causa importante de los signos neurológicos que se desarrollan (Simmons et al. 1982; Kerlero de Rosbo et al. 1985), aunque los fallos en la conducción nerviosa debido a la desmielinización también podrían contribuir (Pender 1987).

6.4- Patogenia

Debido a su homología con la enfermedad humana, los estudios en el modelo animal han permitido conocer mejor las respuestas inmunes implicadas en la patogenia de la EM. Se ha podido estudiar, entre otros, el papel de las diferentes subpoblaciones celulares en el desarrollo de la enfermedad, así como los mecanismos de entrada de las células al SNC o los posibles factores solubles o células implicadas en el proceso de desmielinización.

La EAE, al igual que la EM, se ha considerado históricamente una enfermedad mediada por células Th1 y por las citocinas que éstas secretan: IFN- γ , factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), linfotoxina- α (LT- α) e IL-2, todas ellas con efecto pro inflamatorio. Las dos primeras activan a los macrófagos, que tienen capacidad para destruir a la mielina y a su vez secretar otras citocinas como la IL-12, IL-23 y el TNF- α .

Aunque históricamente se ha creído que la patogenia de la EAE venía dada por una desregulación en el balance Th1/Th2, esta teoría ha tenido que ser reconsiderada a la vista de la reciente descripción de una subpoblación de células T CD4⁺ que se caracteriza principalmente por la secreción de IL-17, citocina que da nombre a la población (Th17). Las células Th17 secretan IL-17A, IL-17F, IL-6 y TNF- α . La IL-17 es una citocina pro inflamatoria que se ha implicado en la patogenia de diversas enfermedades autoinmunes y alérgicas (EM, artritis reumatoide, lupus eritematoso, asma bronquial, entre otras). Estimula la producción de otras citocinas pro inflamatorias, quimiocinas, moléculas de adhesión y otros factores y está además implicada en el reclutamiento de neutrófilos al foco de inflamación. El TGF- β junto con la IL-6 tienen una implicación directa en la diferenciación de las células Th17 (Mangan et al. 2006; Veldhoen et al. 2006), mientras que la IL-23 es imprescindible para la supervivencia y/o la proliferación de éstas (Bettelli et al. 2006). La importancia del subtipo celular Th17 en el marco de las enfermedades autoinmunes queda patente en diferentes estudios realizados en EAE, en los que la inhibición del eje IL-23 / IL-17 impide el desarrollo de la enfermedad en los animales (Hofstetter et al. 2005; Komiyama et al. 2006).

En la EAE, al igual que en la EM, también se ha estudiado la participación de otros tipos celulares como las células B. Los pacientes con EM presentan anticuerpos anti-MBP y anti-MOG, cuya presencia se ha asociado en algunos estudios a la desmielinización que se observa en las lesiones de EM (Genain et al. 1999). Estos datos se correlacionan con el hecho que, tanto en la EM como en el modelo experimental (EAE), cuando se ha intentado desviar la respuesta Th1 a Th2, la enfermedad haya empeorado (Genain et al. 1995; Coles et al. 1999a; Coles et al. 1999b). Con todo, el papel que los autoanticuerpos juegan en la EM es muy controvertido. La presencia de anticuerpos anti-MOG, anti-MBP o ambos en pacientes con síndrome clínico aislado, un único episodio clínico sugestivo de EM, se ha asociado a la aparición más temprana de un segundo brote y a la evolución hacia una EM clínicamente definida (Berger et al. 2003). Contrariamente, existen evidencias que

demuestran que la presencia de anticuerpos anti-mielina no es predictiva de EM clínicamente definida en pacientes con un único episodio clínico (Kuhle et al. 2007; Pelayo et al. 2007).

6.5- Terapias emergentes para el tratamiento de la EM

A causa de la complejidad de la enfermedad y del desconocimiento de su etiología, no existe una cura para la EM. En el brote agudo, los pacientes son tratados con dosis elevadas de prednisona o metilprednisolona (Miller et al. 2000). En cuanto al tratamiento a largo plazo, actualmente se utilizan diferentes preparados aprobados para el tratamiento de la EM. Por ejemplo, el IFN- β y el acetato de glatirámico son tratamientos inmunomoduladores que reducen la frecuencia y la gravedad de los brotes clínicos en las formas RR (ambos tratamientos) y SP (el IFN- β), así como el desarrollo de nuevas lesiones activas (Johnson et al. 1998; Jacobs et al. 2000). Los pacientes con un curso progresivo de la EM o los pacientes cuya evolución clínica es muy rápida son tratados con drogas inmunosupresoras como la ciclofosfamida (Mauch et al. 1989) y/o la mitoxantrona (Mauch et al. 1992), para las que se ha descrito una reducción de la tasa de progresión de la enfermedad.

Se buscan terapias alternativas para los pacientes que no responden a los tratamientos convencionales, los que presentan formas más agresivas de la EM y los pacientes con EM PP, para la que no existe tratamiento. El trasplante autólogo de CMH se presenta como un tratamiento alternativo que podría ofrecer a los pacientes la posibilidad de una cura definitiva si se aplica en las fases iniciales de la enfermedad. El beneficio del trasplante autólogo de CMH reside en la eliminación de las células autorreactivas por el régimen de acondicionamiento previo al trasplante (mielo e immunoablato) y en la reconstitución de un nuevo sistema inmune (lo que se denomina reinicio o *reset* del sistema inmune) a partir de las propias CMH del paciente. Se ha observado que la diversidad clonal en estos pacientes es mucho mayor respecto a la existente antes del trasplante, lo que favorecería un ambiente tolerogénico por encima de la autoinmunidad (Muraro et al. 2005; Muraro and Douek 2006). Aunque hasta ahora se han sometido a un trasplante autólogo de CMH alrededor de 350 pacientes con EM en todo el mundo, la eficacia de este tratamiento es difícil de evaluar debido al bajo número de pacientes incluidos en los distintos estudios, la alta heterogeneidad en los regímenes de acondicionamiento y trasplante, y sobretodo por la inclusión de pacientes mayoritariamente con una EM muy avanzada.

Es en los individuos con un alto grado de discapacidad en los que se observa una progresión de la enfermedad después del trasplante, seguramente debido al escaso componente inflamatorio y al predominio de procesos neurodegenerativos, en los que las CMH difícilmente pueden influir. Estas observaciones clínicas se corroboran en el modelo animal de la EM. Si el trasplante de CMH se realiza en la fase aguda de la enfermedad, cuando mayoritariamente se dan procesos inflamatorios, se consigue revertir los signos clínicos de los animales, mientras que si el trasplante se realiza en la fase crónica, cuando se han acumulado ya daños neuronales, la eficacia del tratamiento es mucho más reducida (Herrmann et al. 2005). Así, la perspectiva de futuro para el trasplante autólogo de CMH pasa por la elección de pacientes con un componente inflamatorio importante y con niveles bajos de discapacidad, ya que en pacientes con EM avanzada la relación riesgo/beneficio del trasplante autólogo es desfavorable.

La inmunoablación con dosis altas de ciclofosfamida es otro de los tratamientos que podría curar definitivamente la EM siempre y cuando el componente neurodegenerativo sea mínimo. Se basa en intentar eliminar el sistema inmune enfermo pero respetando el compartimento mieloide, lo que evita la necesidad de un trasplante hematopoyético (Brodsky et al. 1998). Las CMH de la MO se encargarían de reconstituir de nuevo el sistema inmune, reiniciándolo teóricamente bajo una situación tolerogénica. Aunque el número de pacientes sometidos a inmunoablación es hasta el momento más limitado que el de tratados con un TPH autólogo, parece que la seguridad del tratamiento y la tolerancia es mejor que en el trasplante autólogo, eliminando el riesgo de reinfundir células maduras contaminantes que puedan reproducir la enfermedad. Por el contrario, la depleción de células maduras es menor comparado con la depleción que se consigue con los diferentes regímenes de acondicionamiento mieloablativos previos al TPH. El TPH autólogo y la inmunoablación con dosis altas de ciclofosfamida se presentan como las únicas terapias capaces de reiniciar el sistema inmune e inducir remisiones persistentes de la enfermedad sin necesidad de otras terapias añadidas.

Con todo, la elevada toxicidad asociada a estos dos tratamientos ha hecho necesaria la investigación, en la EAE, de nuevas estrategias menos tóxicas para inducir tolerancia específica frente a los antígenos candidatos. En el modelo experimental se ha ensayado la administración de los péptidos y proteínas que se usan para la inducir

la enfermedad, tanto por vía oral (una vía de administración que ha demostrado ser tolerogénica), como por vía i.v. para inducir tolerancia. La administración oral de la MBP previno la aparición de la enfermedad cuando se administraba a dosis altas, y también remitió los signos clínicos cuando se administró una vez la enfermedad estaba establecida (Meyer et al. 1996). Al contrario, la administración i.v. de los péptidos 139-151 de la PLP (en el modelo remitente-recurrente) y 84-96 de la MBP (en el modelo agudo de la enfermedad) en la fase de inducción de la EAE no previno la aparición de la enfermedad. Cuando se administraron los péptidos encefalitogénicos introducidos en una proteína (la Ii) que los dirige a la vía de presentación de clase II, los ratones quedaron protegidos de desarrollar la EAE (Bischof et al. 2001). Chen y colaboradores desarrollaron una estrategia para prevenir la EAE usando terapia génica en células B, que transdujeron con un vector retroviral que codificaba para el péptido encefalitogénico PLP₁₃₉₋₁₅₁ unido a una secuencia que lo dirigía a la vía de clase II. La expresión constitutiva de antígenos en linfocitos B no activados, en ausencia de señales coestimuladoras, produjo anergia de los clones T específicos para este antígeno, y previno la aparición de la enfermedad en los ratones tratados (Chen et al. 2001). En ambos trabajos se demuestra la importancia de dirigir la presentación de los péptidos encefalitogénicos a la vía de clase II para conseguir una presentación adecuada en un ambiente tolerogénico después del tratamiento. En este mismo sentido, se ha publicado un estudio en el que se generaron DC derivadas de células madre embrionarias modificadas genéticamente para que expresaran simultáneamente el péptido MOG introducido en la Ii y las proteínas inductoras de apoptosis *Programmed Death Ligand-1* (PDL-1) o TRAIL (miembro de la superfamilia TNF). La administración de las DC coexpresando las dos proteínas (la Ii con el péptido MOG y PDL-1 o TRAIL) previno la aparición de la enfermedad cuando se inyectaron unos días antes de la inmunización (Hirata et al. 2005). Otros grupos han tratado de desarrollar estrategias terapéuticas para conseguir un beneficio a largo plazo que cambie favorablemente el curso natural de la enfermedad. Como se ha comentado anteriormente, el sistema hematopoyético tiene un potencial tolerogénico que lo diferencia del resto de tejidos. Se hipotetiza que las proteínas o los péptidos que se expresan en APC derivadas del sistema hematopoyético son considerados como propios y los timocitos que los reconocen en su proceso de maduración tímica son deleccionados y no pasan a formar parte del repertorio de linfocitos T del individuo. Siguiendo esta premisa, se han publicado varios estudios en los que se transdujeron células de MO con vectores retrovirales que codificaban para proteínas como la MBP o la PLP. Aunque el trasplante de células de MO que expresaba la proteína PLP, previo acondicionamiento con 3 Gy de ICT, resultó en la mejoría de los signos clínicos de la

enfermedad ya establecida (Xu et al. 2006), estos resultados se contradicen con los obtenidos anteriormente por Peters y colaboradores, que usando la misma estrategia no sólo no consiguieron tolerizar a los animales en el modelo agudo sino que éstos desarrollaron una enfermedad mucho más grave e incluso indujeron la EAE en una cepa resistente después del trasplante de MO transducida con MBP (Peters et al. 2000).

6.6- Limitaciones del modelo animal de la EM

La EAE comparte características histopatológicas con la enfermedad humana: destrucción de la mielina que recubre a los axones, presencia de lesiones en el SNC, especialmente en la médula espinal y en el tronco encefálico aunque en la EM las lesiones se presentan tanto en la sustancia blanca del cerebro como de la médula espinal, y localización de las lesiones generalmente alrededor de los vasos sanguíneos. Además, las diferentes fases de ambas enfermedades son comunes: primero se da una fase inflamatoria, en segundo lugar desmielinización, gliosis y finalmente remielinización parcial. Además, hay mucha variedad de cursos clínicos dependiendo de la especie de elección así como del péptido o de la proteína que se use para inducir la EAE. Por esta razón, la EAE se ha utilizado durante muchos años como un buen modelo de EM que ha sido útil para desarrollar tratamientos para la EM. Aunque algunos de los actuales tratamientos aprobados para la EM fueron previamente ensayados en el modelo animal (como la mitoxantrona y el acetato de glatirámico), no deja de ser cierto que en otros tratamientos probados en humanos se detectaron efectos adversos que no se habían observado en los animales.

La principal limitación de la EAE, que por otra parte constituye una ventaja, es la especificidad de la respuesta que se induce. Actualmente, la mayoría de grupos utiliza péptidos derivados de proteínas mielínicas para inducir la enfermedad, provocando una respuesta inmune específica frente al péptido encefalitogénico. De esta manera el modelo es mucho más reproducible y homogéneo, y se consigue que la mayoría de los ratones desarrollen la enfermedad siguiendo un patrón clínico muy similar. Ésta es una gran diferencia con la EM, de la cual no se conoce ni la etiología ni los antígenos que desencadenan la respuesta autoinmune. A pesar de las limitaciones del modelo animal, la EAE es el mejor modelo que hay disponible y sigue siendo imprescindible para conocer mejor la EM y para desarrollar nuevas terapias.