



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

DISCUSIÓN

PARTE I. INDUCCIÓN DE TOLERANCIA EN LA EAE MEDIANTE LA EXPRESIÓN DE UN AUTOANTÍGENO EN EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO: APROXIMACIONES PREVENTIVAS Y TERAPÉUTICAS

Este trabajo se inició con la finalidad de explorar nuevas estrategias terapéuticas para inducir tolerancia frente a antígenos mediante la expresión de éstos en células del sistema hematopoyético murino y su trasplante usando pautas de acondicionamiento poco tóxicas o incluso prescindiendo de ellas. Así pues, la estrategia combina la terapia génica con la terapia celular. Se eligió el modelo animal de la EM por ser una enfermedad con gran impacto social para la que no existe tratamiento curativo.

La EAE, modelo animal de la EM, se ha utilizado durante muchos años tanto para estudiar la patogenia de la enfermedad como para ensayar nuevas terapias. La EAE es una enfermedad inducible experimentalmente mediante la inmunización de cepas susceptibles con antígenos de la mielina, lo que sugiere la existencia en la periferia de células T autorreactivas que han escapado de la delección tímica, lo que demuestra la ausencia de tolerancia central. La funcionalidad de estas células está controlada por diferentes mecanismos de tolerancia periférica, entre los que se ha descrito la importante función de la supresión mediada por las células Treg ya que la depleción *in vivo* de éstas provoca el empeoramiento de los signos clínicos de la EAE (Montero et al. 2004; Reddy et al. 2004). La curación definitiva de la EM cuando el proceso que predomina es el inflamatorio, así como de otras enfermedades autoinmunes, requiere el establecimiento de la tolerancia frente a los autoantígenos implicados. En este sentido, se ha descrito que la creación de quimerismo molecular estable (por expresión de un transgén) en el sistema hematopoyético se asocia a tolerancia específica a largo plazo (Bagley et al. 2002a; Bagley et al. 2002b; Alderuccio et al. 2003; Andersson et al. 2003a). El establecimiento de niveles de quimerismo molecular suficientes para inducir tolerancia específica probablemente no requiere del uso de regímenes mieloablativos como los que se emplean en los trasplantes hematopoyéticos convencionales, basados en la ICT a dosis letales y/o en la administración de agentes quimioterápicos como el busulfán a dosis elevadas (Puig et al. 2002; Andersson et al. 2003b). La necesidad de acondicionar para crear espacio en la MO y facilitar el injerto de células hematopoyéticas autólogas o singénicas trasplantadas es motivo de controversia. En el tratamiento de procesos oncológicos de origen hematopoyético, uno de los objetivos del acondicionamiento es eliminar el mayor número posible de células malignas. En los TPH alogénicos convencionales, el

régimen de acondicionamiento incluye no sólo mieloablación (por ejemplo dosis altas de ICT o de busulfán), sino también dosis altas de inmunosupresión (la misma ICT o ciclofosfamida), que va dirigida a evitar el rechazo de las células trasplantadas. En la terapia génica hematopoyética, a pesar de que se utilizan células autólogas, también podría ser necesaria cierta inmunosupresión para evitar el rechazo de las células transducidas, ya que el producto de los transgenes es potencialmente inmunogénico. Estos regímenes de acondicionamiento conllevan una gran toxicidad, que puede ser asumible en el caso de las hemopatías malignas, pero es mucho menos justificable en algunas enfermedades hereditarias, especialmente en aquellas menos letales o cuando existen terapias alternativas válidas. La EM es una enfermedad crónica, de manera que en ocasiones se ha planteado el trasplante hematopoyético, tanto autólogo como alogénico, como una opción terapéutica de larga duración. Este trabajo se inició con la hipótesis que la expresión de un autoantígeno en el sistema hematopoyético, es decir, la creación de quimerismo molecular, es una herramienta útil para inducir tolerancia inmunológica específica en un modelo animal de la EM y que además, para este fin no se requieren pautas de mieloablación total, sino que un régimen mínimo de mielosupresión es suficiente para permitir el injerto estable de un número relativamente reducido de células transducidas que podrían tener un efecto beneficioso.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio indicaban que dosis subletales de ICT (2-4 Gy) antes del trasplante de células de MO singénicas que expresaban EGFP eran suficientes para que el injerto de éstas se mantuviera a largo plazo (22 semanas después del trasplante) en el ratón (Puig et al. 2002). Además, se observó una relación directa entre la dosis de ICT administrada y el nivel de injerto, algo que ya era conocido y esperable. Algunos de los animales trasplantados presentaban microquimerismos moleculares (definidos como la presencia en SP de menos del 1% de células que expresan el transgén) que no se perdían a largo plazo y mantenían su proporción relativa dentro de las células procedentes del donante, lo que sugería que se había inducido tolerancia específica frente a la EGFP, una proteína que ha demostrado ser inmunogénica en ratones C57BL/6J (Han et al. 2008). Así, estas observaciones nos condujeron a la hipótesis que la creación de quimerismos de bajo nivel o microquimerismos moleculares en el sistema hematopoyético utilizando autoantígenos permitiría inducir o reestablecer la tolerancia inmunológica en otras situaciones de mayor interés clínico como podían ser las enfermedades autoinmunes. Decidimos investigar esta estrategia en un modelo de enfermedad autoinmune antígeno específica como es la EAE. Uno de los motivos que más pesó en esta

decisión fue la presencia de los investigadores Dra. Carmen Espejo y Dr. Xavier Montalban en la *Unitat de Neuroimmunologia Clínica* (UNIC) de nuestro centro, que poseían una larga y amplia experiencia en este modelo animal, por lo que iniciamos lo que hasta ahora ha sido una duradera y fructífera colaboración con dicho grupo.

La relación casi lineal entre la dosis de ICT administrada y el nivel de injerto conseguido en el estudio antes mencionado nos indujo a considerar inicialmente este procedimiento como la pauta de acondicionamiento de elección. Dada la naturaleza autoinmune de la EAE y para determinar si la ICT, que tiene un potente efecto inmunosupresor, afectaba al curso clínico de la enfermedad, se realizaron una serie de experimentos preliminares. Para ello se trabajó con el modelo remitente-recurrente de la EAE. Observamos que los signos clínicos fueron más graves en los ratones que habían recibido 4 Gy de ICT un mes antes de la inducción de la enfermedad que en aquellos que no la habían recibido. Asimismo, cuando los ratones recibían la misma dosis de ICT una vez los signos clínicos estaban establecidos, éstos experimentaban inicialmente una recuperación completa debida probablemente a la inmunosupresión asociada a la ICT, pero a continuación desarrollaban un nuevo brote más severo comparable al experimentado por los ratones irradiados un mes antes de la inducción de la enfermedad. Este empeoramiento clínico, asociado a la ICT, podría deberse a diversas causas. Entre ellas, la mayor radiosensibilidad de algunos tipos celulares del sistema inmune, el efecto a corto y largo plazo que la radiación ionizante ejerce en el sistema inmune y los cambios funcionales y celulares que se dan en el SNC después de la exposición a la radiación. Estudios en ratones demuestran que después de la irradiación se reduce el número tanto de células B como T, aunque la depleción es más acusada y se da más rápidamente en las células B, mucho más radiosensibles y que además se regeneran más tarde que las células T (Anderson et al. 1977). Otro efecto importante de la radiación en el sistema inmune es la modificación del equilibrio entre las citocinas antiinflamatorias y las pro inflamatorias. La radiación ionizante *in vivo* induce la expresión de citocinas pro inflamatorias como el TNF- α , IL-1 α/β y la IL-6 en diferentes tejidos por activación del factor de transcripción NF κ B (Zhou et al. 2001; Linard et al. 2003). La IL-6 y el TNF- α , además de las diferentes formas de la IL-17, son citocinas secretadas por el subtipo linfocitario Th17, que a su vez juega un papel importante en la patogenia de la EAE (Langrish et al. 2005). Además, la IL-6 junto con el TGF- β , también está implicada en la diferenciación de las células T CD4⁺ *naïve* a linfocitos Th17 efectoras (Bettelli et al. 2006). Un aumento en estas dos citocinas (IL-6 y TNF- α) podría explicar la mayor gravedad de la EAE observada en los ratones

expuestos a radiación ionizante una vez establecida la enfermedad. Aunque los estudios en animales se han realizado a corto plazo, hay evidencias que indican que individuos expuestos a radiación gamma presentan procesos inflamatorios activos pasados 50 años de la exposición a ésta, encontrándose en su plasma concentraciones de IL-6 más elevadas que en individuos control (Hayashi et al. 2003). Estos datos sugieren que la inflamación crónica asociada a la radiación ionizante podría contribuir al desarrollo más grave de la EAE cuando la exposición se realizó un mes antes de la inducción de la enfermedad. Por otro lado, es conocido que la irradiación afecta a la permeabilidad de la barrera BHE y que provoca cambios que incluyen la apoptosis de las células endoteliales, cambios en la expresión génica como el aumento de la expresión de la molécula de adhesión intracelular ICAM-1 (Nordal and Wong 2004) o del factor de crecimiento endotelial vascular VEGF (Nordal et al. 2004) y alteración del microambiente. Aun así, estos efectos están descritos en un modelo de permeabilización de la BHE en roedores, en los que se precisan dosis altas de irradiación del SNC, y algunos de estos cambios no se observan hasta pasados unos meses después de la irradiación. Para inducir la EAE se administran, además del péptido encefalitogénico y el adyuvante completo de Freund, dos dosis de Tp. Aunque no se conoce exactamente el papel de la Tp en la inducción de la enfermedad, se sabe que es necesaria para permeabilizar la BHE y permitir el paso de las células T activadas al SNC (Brabb et al. 1997). Por ello, el hecho que la BHE se permeabilice cuando se irradia a los ratones no tendría porqué traducirse en un aumento de la gravedad de los signos clínicos, a menos que la BHE sea más permeable y durante un período de tiempo más largo debido a la acción sinérgica de la ICT y la Tp. Hay estudios en ratones que demuestran que dosis altas de radiación ionizante en el SNC producen desmielinización (Chiang et al. 1993) y que la alteración de la mielina se observa muy poco tiempo después de la irradiación de la médula espinal (Chiang et al. 1992). Pero la ICT a dosis letal seguida del trasplante de células de MO en ratas con EAE mejoró el curso clínico de la enfermedad (van Gelder et al. 1993; Herrmann et al. 2005). El hecho que la reconstitución del sistema hematopoyético a partir de células de un donante mejore la enfermedad sugiere que la posible alteración de la mielina causada por la ICT no sería un proceso crucial en nuestro modelo. Además, en nuestros experimentos los ratones irradiados no desarrollaron signos clínicos después de la ICT hasta que se les inducía la EAE y tampoco lo hicieron aquellos ratones a los que se inmunizó con PBS y en ausencia del péptido encefalitogénico. Aunque estos datos sugieren que el empeoramiento observado en los ratones expuestos a radiación ionizante se debería principalmente a cambios en el sistema inmune propiciados por la irradiación, también podría darse el caso que, a causa de la alteración de la mielina, el

antígeno frente al que se desencadena la respuesta inmune quedara más expuesto. Las células autorreactivas resistirían a una dosis de 4 Gy pudiendo reconocer a dicho antígeno y exacerbando la enfermedad. Por el contrario, con una dosis letal de ICT se eliminan las células autorreactivas y el trasplante de células de MO de un donante genera un repertorio de células T no activadas completamente nuevo, que serían incapaces de reaccionar frente a los antígenos de la mielina. Así pues, no podemos descartar que, una vez inducida la EAE, los efectos de la ICT sobre el SNC (alteración de la mielina en el SNC y a cambios de permeabilidad en la BHE) sean relevantes en el empeoramiento de la enfermedad junto con el efecto de la ICT sobre el sistema inmune.

El efecto negativo sobre la EAE de la ICT a la dosis de 4 Gy nos llevó a buscar otras pautas mielosupresivas con menor efecto sobre el sistema inmune y que no modificaran el curso de la enfermedad o lo hicieran en menor grado que la ICT. El busulfán es un agente alquilante con potente actividad mielosupresora pero con escasa o nula actividad inmunosupresora, que se usa en regímenes de acondicionamiento como alternativa a la ICT en TPH. Observamos que la administración de busulfán, a una dosis de 20 mg/Kg/día vía i.p. dos días consecutivos (días 3 y 2 previos al trasplante), no tenía efectos detectables sobre la incidencia ni sobre la gravedad de la EAE, independientemente de que se administrara antes de la inmunización o una vez establecidos los signos clínicos. Contrariamente, el treosulfán, un fármaco análogo del anterior, administrado 20 días antes de la inducción de la enfermedad resultaba en un empeoramiento de los signos clínicos en comparación con animales control. La diferencia en el efecto que ambos agentes tienen sobre el curso clínico de la EAE reside muy probablemente en el mayor efecto sobre el sistema inmune que tiene el treosulfán. Este fármaco, además de tener un efecto mieloablativo inmediato, potente y permanente con escasa toxicidad en otros órganos y tejidos, induce una fuerte depleción de células T y B provocando inmunosupresión y afectando consecuentemente a la producción de citocinas (Sjoo et al. 2006). Sin embargo, Weissert y colaboradores (Weissert et al. 2003) describieron un efecto contrario del treosulfán en la EAE. Administrándolo en ratas el mismo día que se les inducía la enfermedad o 14 días después, los signos clínicos mejoraron significativamente debido a la inmunosupresión producida por este fármaco, y consecuentemente, el porcentaje de células T productoras de IFN- γ disminuyó. Puede que las diferencias observadas en el efecto del fármaco sobre la EAE se deban a la distinta dosis administrada de treosulfán, que en nuestros experimentos fue de tres dosis consecutivas de 1 g/Kg, mientras que los autores citados usaron una dosis total de 1

g/Kg. Por otro lado, el momento en que administraron el treosulfán también es distinto al de nuestros experimentos. Nosotros lo administramos 20 días antes de la inmunización, en teoría tiempo suficiente para que los ratones ya estuvieran recuperados de la inmunosupresión asociada al tratamiento en el momento de la inmunización. Aunque son necesarios más estudios para sacar conclusiones más definitivas en este sentido, creemos que el treosulfán podría tener, como la ICT, efectos a largo plazo sobre el sistema inmune que podrían afectar al equilibrio entre las citocinas pro inflamatorias y antiinflamatorias. Debido a que el tratamiento con busulfán no tenía efectos clínicamente detectables sobre el desarrollo de la EAE en el modelo remitente-recurrente cuando se administraba antes o después de la inducción de la enfermedad y a que las dosis utilizadas no eran letales y facilitaban el injerto estable de las células de MO del donante así como el establecimiento de quimerismo molecular en ratones normales, decidimos adoptar definitivamente la pauta de busulfán a la dosis mencionada como régimen de acondicionamiento en los experimentos subsiguientes. Además, dado que esta línea de trabajo se alejaba de los objetivos inicialmente planteados en nuestro proyecto, decidimos no hacer más experimentos en este sentido.

Para nuestros experimentos de prevención y terapia de la EAE decidimos trabajar con el modelo no remitente de la EAE. En el modelo remitente-recurrente se ha descrito y caracterizado el fenómeno de la amplificación epitópica (*epitope spreading*) (Vanderlugt et al. 2000), que hasta el momento no se ha documentado en la forma no remitente de la EAE. Por ello pensamos que, en el primer modelo, una estrategia basada en el empleo de un único antígeno para inducir tolerancia tendría, *a priori*, menos probabilidades de éxito por la posibilidad que al trasplantar las células terapéuticamente ya se hubieran producido respuestas inmunes frente a otros antígenos o epítopes, y por ello, aunque se indujera tolerancia frente al autoantígeno que inicia la respuesta inmune, no sería suficiente para modificar el curso clínico de la enfermedad experimental. Por esta razón, realizar el brazo terapéutico en el modelo no remitente nos podía aportar, además, datos indirectos de la existencia o ausencia de amplificación epitópica en este modelo concreto. Por otro lado, en el modelo crónico no remitente no hay evidencias que demuestren la expresión de la MOG en el timo humano y de ratón. Bruno y colaboradores demostraron la ausencia del transcrito de la MOG en el timo humano (Bruno et al. 2002), aunque otros han descrito la presencia del mRNA de la glicoproteína únicamente en las células epiteliales de la médula tímica en humanos (Gotter et al. 2004) y en el timo de ratones C57BL/6J (Delarasse et al. 2003), pero en ningún caso se ha detectado la presencia de la

proteína MOG en este órgano linfóide responsable de la generación de tolerancia central. Más recientemente se ha descrito que ratones deficientes en MOG tienen el mismo repertorio clonal de células T que ratones C57BL/6J, la cepa parental, lo que sugiere que no se crea tolerancia central por delección clonal de los timocitos reactivos frente a la MOG (Fazilleau et al. 2006).

Una vez comprobamos que el busulfán tampoco afectaba, aparentemente, al curso clínico de la EAE inducida con MOG, lo siguiente que nos planteamos fue si la expresión estable del autoantígeno en el sistema hematopoyético era capaz de impedir el desarrollo de la EAE de manera preventiva. Para obtener una buena presentación del autoantígeno por la vía de clase II usamos una estrategia descrita anteriormente en la literatura basada en la sustitución de la región CLIP de la Ii por el péptido antigénico de interés (Carstens et al. 2000). La proteína Ii con la región CLIP reemplazada por los péptidos MBP₈₄₋₉₆ y PLP₁₃₉₋₁₅₁ activaron específicamente células T de forma más eficiente que los propios péptidos encefalitogénicos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Por otro lado, la administración de las proteínas Ii modificadas en condiciones tolerogénicas fue más potente para evitar el desarrollo de la EAE que la administración de cantidades equivalentes de los mencionados péptidos (Bischof et al. 2001). Para expresar el autoantígeno en las células hematopoyéticas se usaron vectores retrovirales basados en el virus MoMuLV (Hildinger et al. 1999). Los vectores retrovirales se integran en el genoma de la célula diana, dando lugar a una expresión del transgén sostenida en el tiempo, siendo por lo tanto adecuados para este trabajo, en el que pretendíamos expresar de forma estable el péptido MOG₄₀₋₅₅ en el sistema hematopoyético murino. Se generaron líneas celulares productoras estables de alto título viral para minimizar la variabilidad en términos de eficiencia de transducción entre los diferentes experimentos. Una vez verificadas todas las secuencias de los vectores retrovirales y generados los primeros sobrenadantes ricos en partículas infecciosas, había que analizar si las células diana transducidas expresaban las proteínas adecuadas. Al no disponer de anticuerpos que reconocieran la MOG₄₀₋₅₅, decidimos comprobar la sobreexpresión de la Ii, como aproximación indirecta. Usamos un anticuerpo monoclonal anti-CD74 (Ii) murino que nos permitió detectar una mayor expresión de la proteína en células de MO murina transducidas con los vectores SF91-IiMOG-IRES-EGFP y SF91-Ii-IRES-EGFP respecto a los niveles basales detectados en la MO sin transducir o transducidas con un vector retroviral que solamente codificaba para la EGFP. En células transducidas con los vectores bicistrónicos, observamos que la sobreexpresión de Ii se correlacionaba con la expresión del gen

marcador EGFP, lo que nos indicaba de forma indirecta la correcta expresión de ambos transgenes, liMOG e li, en células hematopoyéticas murinas.

En los experimentos preventivos, el trasplante de células de MO que expresaban la liMOG en ratones acondicionados con dosis parcialmente mieloablativas de busulfán resultó en quimerismo del donante y quimerismo molecular un mes después del trasplante en la inmensa mayoría de los receptores y además los protegió de la enfermedad. La tolerancia antígeno específica se puede inducir por varios mecanismos, entre los que se encuentran la delección clonal a nivel tímico (tolerancia central), la anergia de células T reactivas y la generación de células Treg, las dos últimas a nivel periférico. A nivel tímico, tanto las DC como las epiteliales presentan a los timocitos un amplio repertorio de nuestros autoantígenos, induciendo tolerancia mediante delección clonal (Brockner et al. 1997; Kyewski and Klein 2006). La tolerancia central y la delección clonal a nivel periférico son los mecanismo que dan lugar a la tolerancia más robusta, pues implica que las células autorreactivas están literalmente ausentes, mientras que la tolerancia mediada por células Treg (o cualquier otro tipo de tolerancia periférica que no implique delección) es teóricamente reversible debido a la permanencia de células T potencialmente reactivas en la periferia. Se ha descrito que la introducción del aloantígeno H-2K^b en el sistema hematopoyético murino con vectores retrovirales indujo tolerancia central en el compartimiento T CD8⁺, seleccionando negativamente en el timo aquellas células T inmaduras reactivas frente a éste (Kang and Iacomini 2002). Sin embargo, aplicando la misma estrategia con el mismo aloantígeno, la tolerancia inducida en las células T CD4⁺ no fue debida a delección clonal de las células T CD4⁺ específicas para H-2K^b, sino a la generación de células Treg específicas. En este estudio, Iacomini y colaboradores (Forman et al. 2006) propusieron un modelo en el que la expresión del aloantígeno H-2K^b en el sistema hematopoyético inducía tolerancia central de las células T CD8⁺ y periférica de las células T CD4⁺. Por ello no podemos descartar que ambos mecanismos estén implicados en la tolerancia observada en nuestro modelo en los experimentos preventivos. Además, a diferencia de los modelos propuestos por otros autores en los que usan dosis letales de ICT como tratamiento acondicionador previo al TPH con la finalidad de inducir tolerancia (Steptoe et al. 2003; Xu et al. 2006), nosotros no creemos que tal estrategia pueda ser usada razonablemente en la clínica con el único fin de inducir tolerancia, por lo que hemos usado un acondicionamiento subletal y parcialmente mieloablativo en el que las células autorreactivas periféricas del receptor no se eliminan, al menos completamente, persistiendo en el organismo después del trasplante y pudiendo desencadenar la respuesta inmune una vez se inmuniza con el

péptido encefalitogénico. Pensamos que el trasplante de células de MO transducidas con el vector liMOG estaría induciendo tolerancia periférica (por anergia o generación de células Treg específicas) suprimiendo específicamente la capacidad efectora de las células T autorreactivas. Esta tolerancia se habría mantenido activa a lo largo del seguimiento clínico en los 13 ratones protegidos, mientras que no habría sido suficiente para controlar a las células T autorreactivas en los 5 ratones no protegidos. Por otro lado, se ha descrito que las células T maduras pueden recircular por el timo y ser reseleccionadas (Tian et al. 2004), por lo que aunque el régimen de acondicionamiento usado en nuestros experimentos no eliminara por completo la hematopoyesis del receptor ni las células maduras de la periferia, entre las que se encontraban los linfocitos autorreactivos, no descartamos la participación de mecanismos de tolerancia central en este modelo. La EAE inducida con PLP en ratones de la cepa SJL (modelo remitente-recurrente) se pudo prevenir eficazmente expresando niveles altos de la proteína entera en el sistema hematopoyético de los ratones receptores sometidos a mieloablación letal (Xu et al. 2006). Por el contrario, la expresión de la proteína MBP entera no sólo no protegió a los ratones tratados preventivamente de desarrollar la enfermedad, sino que además aumentó la susceptibilidad a desarrollar la EAE en una cepa de ratón resistente a la enfermedad (Peters et al. 2000). Ambos grupos usaron protocolos experimentales parecidos, incluso acondicionaron a los receptores con la misma dosis de ICT (9 Gy) y trasplantaron dosis celulares similares (aproximadamente 5×10^6 CMN y $2,5 - 5 \times 10^6$ CMN respectivamente). Se sabe que, en el humano, tanto la PLP como la MBP tienen epítopes de expresión restringida al SNC (Pribyl et al. 1993; Bruno et al. 2002). Podría suceder que el péptido 139-151 de la PLP, en la cepa SJL de ratón, se expresara únicamente en el SNC, mientras que los péptidos de la MBP usada por Peters y colaboradores (Peters et al. 2000) se expresaran también en timo en las cepas utilizadas y por esa razón no consiguieran inducir tolerancia expresando la MBP en el sistema hematopoyético. En un modelo animal de diabetes (ratones NOD, del inglés *non-obese diabetic*), el quimerismo molecular inducido mediante la expresión de la proinsulina II tanto en células de MO de ratones transgénicos para el transgén como en células de MO transducidas con un vector retroviral que codificaba para la proinsulina II bajo el control de un promotor específico de APC, protegía a los ratones de desarrollar diabetes (Steptoe et al. 2003; Chan et al. 2006). En estos estudios, para acondicionar a los ratones se usaron dosis letales o bien dosis subletales relativamente altas (6,5-8 Gy) de ICT, depleccionando además las células T CD4⁺. En nuestros experimentos comprobamos que la protección frente a la EAE se producía en animales con quimerismo molecular para el autoantígeno, pero era independiente del

nivel de este quimerismo. Incluso en algunos animales que presentaban microquimerismo molecular se indujo tolerancia y protección frente a la enfermedad. El tratamiento preventivo también resultó ser efectivo para inducir tolerancia B ya que evitaba de forma eficaz la respuesta humoral. La inmensa mayoría de ratones del grupo liMOG no produjeron anticuerpos anti-MOG₄₀₋₅₅ tras la inmunización con el autoantígeno, y los que lo hicieron tenían niveles significativamente inferiores a los observados en el grupo de ratones tratados con el vector control. La patogenicidad de los anticuerpos anti-MOG en la EM y en la EAE en particular es una cuestión controvertida. Se han identificado anticuerpos anti-MOG patogénicos en el suero de pacientes de EM (Berger et al. 2003; Zhou et al. 2006). Además, de los cuatro patrones de desmielinización descritos en pacientes de EM, las lesiones clasificadas en el patrón II estarían causadas por células T y por anticuerpos, aunque no se ha identificado los epítopes que reconocen (Lucchinetti et al. 2000). Sin embargo otros autores no encontraron asociación entre la presencia de anticuerpos anti-mielina y la evolución de un síndrome clínico aislado hacia EM (Kuhle et al. 2007; Pelayo et al. 2007). En la EAE, hay evidencias que apoyan la patogenicidad de los anticuerpos anti-MOG. Así, éstos se detectaron en lesiones desmielinizantes y, además, su transferencia pasiva aumentó la gravedad de la EAE (Adelmann et al. 1995; Genain et al. 1995; Genain et al. 1999). Por otra parte, la transferencia de suero de ratones inmunizados a ratones deficientes en células B reestableció la susceptibilidad de éstos a la enfermedad (Lyons et al. 2002). Todos estos datos sugieren la posible patogenicidad de los anticuerpos tanto en el modelo animal como en la enfermedad humana. En este sentido se ha descrito que la inducción de la EAE era independiente de las células B cuando se inmunizaron ratones con el péptido MOG₃₅₋₅₅ de rata (rMOG₃₅₋₅₅) pero las células B eran necesarias si el péptido usado era el humano (hMOG₃₅₋₅₅). En ambos casos, sin embargo, se detectó la presencia de anticuerpos anti-MOG en el suero de los ratones inmunizados (Oliver et al. 2003). En ausencia de un péptido encefalitogénico que desencadenara una respuesta celular fuerte, como es el caso de la hMOG₃₅₋₅₅, la contribución de las células B demostró ser crucial, y los anticuerpos anti-MOG adquirieron un papel mucho más importante en la patogenia de la EAE provocando cambios drásticos en la fisiología de los oligodendrocitos (Marta et al. 2005). Contrariamente, cuando la respuesta celular T generada era suficientemente potente (como la que desencadena el péptido rMOG₃₅₋₅₅), los anticuerpos anti-MOG no parecían ser patogénicos (Marta et al. 2005). En el presente trabajo se usó el péptido MOG₄₀₋₅₅ de rata. La diferencia en el mecanismo patogénico de la EAE inducida con los péptidos humano o de rata reside únicamente en el cambio de un aminoácido en la posición 42 (Oliver et al. 2003; Marta et al. 2005). Por ello

asumimos que el péptido usado en este trabajo desencadenaría el mismo mecanismo patogénico que la rMOG₃₅₋₅₅, es decir, independiente de respuesta humoral. No hemos podido establecer una relación entre la presencia de anticuerpos anti-MOG₄₀₋₅₅ y la protección frente a la enfermedad. En el suero de dos ratones protegidos pudimos detectar anticuerpos anti-MOG₄₀₋₅₅, mientras que no los detectamos en el de ratones del grupo control que sí enfermaron, lo que apoya la idea que, en nuestro modelo, éstos no serían patogénicos, o al menos no tendrían una función relevante en el desarrollo de la enfermedad. Aunque en la EAE inducida con el péptido rMOG₃₅₋₅₅ los anticuerpos tienen un papel irrelevante en el inicio y perpetuación de la enfermedad, la respuesta humoral es importante en la patogenia de otras enfermedades autoinmunes como la tiroiditis (Stafford and Rose 2000) o la gastritis autoinmune (Whittingham and Mackay 2005). Hemos demostrado que, en nuestro modelo, el establecimiento de quimerismo molecular usando pautas mínimas de mieloablación es un procedimiento eficaz para prevenir el desarrollo de respuestas inmunes tanto a nivel celular como humoral.

Los resultados obtenidos con el tratamiento preventivo tienen una relevancia relativa en cuanto a su aplicabilidad a la clínica. La toxicidad asociada al trasplante de MO por efecto de los regímenes de acondicionamiento o el riesgo de desarrollar procesos malignos debido a la inserción del vector retroviral en el genoma de las células trasplantadas, hacen que el uso de este tipo de procedimiento en la clínica no esté justificado para prevenir enfermedades no letales. Por ello, el siguiente paso fue aplicar la misma estrategia cuando los animales ya tenían la enfermedad establecida, es decir, realizando un abordaje terapéutico. En este caso, el desafío era muy superior al del abordaje preventivo, pues se sumaba el hecho que en los ratones con EAE, al haber sido inmunizados con el autoantígeno, ya tenían una respuesta inmune establecida frente al péptido MOG₄₀₋₅₅, lo que podría impedir el injerto de las células hematopoyéticas trasplantadas que expresaran el autoantígeno y anular su potencial efecto terapéutico. El trasplante de dosis relativamente bajas de células de MO transducidas con el vector que expresaba la liMOG en ratones con la EAE establecida resultó en una mejoría significativa de los signos clínicos. En la mayoría de los ratones que recibieron las células que expresaban la liMOG se observó una remisión de los signos clínicos en algún momento del seguimiento y más notable es el hecho que un tercio de estos ratones se recuperaron completamente, quedando la mayoría de ellos libres de enfermedad hasta el final del seguimiento clínico. Xu y colaboradores consiguieron inducir tolerancia en el modelo remitente-recurrente de la EAE expresando la PLP usando una dosis de ICT parcialmente mieloablativa (3 Gy),

aunque a diferencia de nuestro trabajo, usaron dosis celulares elevadas (como mínimo de 5×10^6 células de MO total) (Xu et al. 2006). La dosis celular utilizada en nuestros experimentos (del orden de 10^6 CMN por receptor) es proporcionalmente menor incluso que la que se emplea en los trasplantes hematopoyéticos humanos. En la clínica humana, en el trasplante de CMH se usan dosis mínimas de $1-2 \times 10^6$ células $CD34^+$ por kg de peso, el equivalente a $1-2 \times 10^8$ CMN por kg. Nosotros usamos dosis celulares de 5×10^7 CMN por Kg, cinco veces menos que las $2,5 \times 10^8$ CMN por kg como mínimo que trasplantan en el trabajo anteriormente mencionado. Creemos que el empleo de dosis celulares relativamente reducidas hace el procedimiento más seguro y más cercano a una posible aplicación clínica. Otra diferencia esencial con el trabajo de Xu y colaboradores reside en dirigir el antígeno a la vía de clase II, que creemos es importante para inducir tolerancia sin necesidad de trasplantar un gran número de células transducidas, ya que esta estrategia optimiza la presentación antigénica. Extrapolando los resultados obtenidos por Bischof y colaboradores (Bischof et al. 2001), la sustitución de la región CLIP por el péptido MOG₄₀₋₅₅ favorecería la unión del péptido a la hendidura del MHC-II en la mayoría de los casos, haciendo que el sistema sea más eficiente que expresando una proteína entera, lo que además soslayaría la necesidad de conseguir niveles altos de expresión del transgén en las células diana.

El hecho que fuéramos capaces de inducir tolerancia en un número significativo de ratones cuando la respuesta inmune ya se había desencadenado es una evidencia indirecta de que, o bien el fenómeno del *epitope spreading* no se da en el modelo no remitente de EAE, o éste es capaz de frenarse induciendo tolerancia frente al antígeno desencadenante. La primera posibilidad concordaría con lo observado en un trabajo publicado recientemente en el que los autores no encontraron evidencias de amplificación de la respuesta inmune frente a otros epítopes de la mielina y apuntan a la clara implicación de la diversidad del repertorio de células T en el desarrollo de los diferentes brotes de la enfermedad en un modelo de EAE inducida con rMOG₃₅₋₅₅ en ratones deficientes para la enzima TdT (Fazilleau et al. 2007).

La mejoría clínica se correspondió con los datos histopatológicos obtenidos, en los que se observó una extensión significativamente menor del área de desmielinización, así como la reducción significativa del componente inflamatorio en el SNC. Contrariamente, el nivel de anticuerpos específicos frente a MOG₄₀₋₅₅ no se vio alterado por el abordaje terapéutico. Eso no significa necesariamente que nuestro protocolo no sea capaz de inducir tolerancia a nivel humoral, ya que los anticuerpos

poseen una vida media muy larga, por lo tanto la inducción de tolerancia B podría verse enmascarada por la permanencia de los anticuerpos producidos anteriormente a la intervención terapéutica. De acuerdo con los resultados de Marta y colaboradores (Marta et al. 2005), la presencia de los anticuerpos en ratones que experimentaron remisión clínica en nuestro modelo refuerza la idea que éstos no juegan un papel relevante en la patogenia de este modelo de EAE.

A pesar de la remisión de los signos clínicos en un número significativo de los ratones del grupo liMOG, no se detectó quimerismo molecular en prácticamente ninguno de ellos aunque todos tenían niveles detectables de quimerismo del donante. Ello indica que la mieloablación parcial utilizada funcionó y que la dosis celular infundida fue suficiente para asegurar el injerto. Contrariamente, en los ratones trasplantados con las células que expresaban li se observó quimerismo molecular un mes después del trasplante, al igual que en los ratones liMOG inmunizados con PBS y por tanto, no presensibilizados frente al autoantígeno. El conjunto de estas observaciones sugiere que la ausencia de quimerismo molecular en los grupos de ratones liMOG se debería a un rechazo inmunológico específico de las células transducidas que expresaban el péptido MOG₄₀₋₅₅, con toda probabilidad debido a la existencia previa de una respuesta inmune frente a éste. Descartamos la posibilidad que el injerto fallara en el grupo liMOG ya que ambos grupos trasplantados seguían un patrón de reconstitución hematopoyética equivalente a partir de células del donante. Así, por una parte, en animales con EAE y por tanto con una respuesta inmune establecida frente al autoantígeno, las células transducidas trasplantadas fueron rechazadas debido a la respuesta inmune anti-MOG₄₀₋₅₅. Sin embargo, la terapia antígeno específica produjo una mejoría clínica significativa, que no se observó en los receptores trasplantados con células transducidas con el vector control a pesar que éstos no rechazaron las células transducidas, lo que indicaba que se había inducido tolerancia específica. La inducción de tolerancia en ausencia de expresión del transgén (factor VIII humano o hFVIII) a nivel de proteína fue descrita en un modelo de ratón deficiente en FVIII de coagulación (Evans and Morgan 1998) en el que se utilizaba un protocolo similar al nuestro pero con algunas diferencias, ya que inducían tolerancia de forma preventiva y ocho meses después del trasplante detectaban la presencia del vector retroviral a nivel de ADN y ARN en las células hematopoyéticas de los animales receptores. A pesar de no observar niveles detectables del factor en el suero de los ratones trasplantados, no se puede descartar que las células hematopoyéticas transducidas expresaran los péptidos antigénicos del FVIII de una forma tolerogénica, aunque este hecho no fue investigado. La recuperación clínica en ausencia de quimerismo molecular junto con la

rapidez con la que ésta se producía (el inicio de la recuperación se inició entre el día 2 y 16 después del trasplante) sugiere que el mecanismo de tolerancia inducido es periférico y no central. Un requisito imprescindible para que se de delección clonal a nivel tímico es la expresión en el timo del antígeno en cuestión. Como pudimos observar, la mayoría de ratones del grupo liMOG no expresaba el vector retroviral en ninguno de los tejidos hematopoyéticos estudiados, incluyendo órganos linfoides como el timo y el bazo, lo que descarta la participación de la delección tímica como mecanismo de tolerancia en nuestro modelo. Los mecanismos periféricos de tolerancia incluyen la muerte por apoptosis, la anergia y la supresión de la función efectora por acción de células T reguladoras. En el sobrenadante de esplenocitos de los ratones liMOG se hallaron concentraciones significativamente superiores de IL-5 e IL-10. La IL-10 es una citocina producida por múltiples tipos celulares del sistema inmune (células B, T, DC, macrófagos y mastocitos) y está regulada principalmente por la IL-12, secretada por macrófagos y mastocitos. La IL-10 es una citocina antiinflamatoria capaz de modular la función pro inflamatoria de las células T, NK, macrófagos y mastocitos, inhibiendo la producción de IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12 y TNF- α . Además de inhibir la expresión de citocinas pro inflamatorias, la IL-10 también disminuye la expresión tanto de moléculas del MHC-II como de moléculas coestimuladoras en las APC y promueve la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células B a células plasmáticas (productoras de anticuerpos) (Groux and Cottrez 2003). La IL-10 es responsable de la generación de células Tr1 a partir de células T CD4⁺ naïve. Las células Tr1 se inducen por exposición a un antígeno en presencia de IL-10 y se caracterizan por secretar niveles altos de IL-10, IL-5 y TGF- β (Bacchetta et al. 1994; Groux et al. 1997). Regulan las respuestas inmunes mediante la secreción de IL-10 y TGF- β . Aunque las células Tr1 son inducibles, antígeno específicas y necesitan ser activadas a través de su TCR, realizan su función inmunomoduladora de forma independiente de antígeno (Roncarolo et al. 2006). Las células Treg son fenotípicamente identificables por la expresión de los marcadores CD4, CD25 y del factor de transcripción FoxP3. Se generan en el timo y también producen IL-10. *In vitro* las Treg ejercen sus funciones supresoras interaccionando directamente con las células efectoras, aunque existen otros mecanismos como la secreción local de citocinas antiinflamatorias (TGF- β , IL-10) que ellas mismas pueden secretar, o pueden inducir a las APC para que las produzcan, o la competición por factores de crecimiento (Sojka et al. 2008). Algunos autores han especulado que las dos subclases de células T reguladoras actuarían sinérgicamente. Las Treg serían reclutadas tempranamente al lugar de la inflamación para controlar la magnitud de la respuesta inmune mientras que las Tr1 serían reclutadas posteriormente para atenuar la respuesta (Roncarolo et al.

2006). En un modelo murino de diabetes tipo I se ha demostrado la participación simultánea y sinérgica de ambas estirpes celulares en la inducción de tolerancia en ratones tratados con rapamicina e IL-10 (Battaglia et al. 2006). En este estudio se demuestra que la actividad supresora de las Treg y las Tr1 no se solapan, sino que cada una ejerce una función supresora diferente. En este modelo de diabetes las Tr1 no se encontraron en el infiltrado pancreático sino en el bazo, donde los niveles de IL-5, IL-10 y TGF- β eran significativamente superiores en los ratones tratados con IL-10 y rapamicina, mientras que estas citocinas, que caracterizan a la población Tr1, no se encontraron elevadas ni en los ganglios ni en el infiltrado pancreático. Por otro lado, el porcentaje de Treg era muy superior principalmente en el infiltrado pancreático y no en los ganglios ni el bazo. Los autores creen que cuando la tolerancia ya está establecida, las Tr1 dejarían las áreas de inflamación y serían reclutadas en el bazo. Su papel sería evitar la migración de células efectoras a los ganglios, mientras que las Treg serían reclutadas al sitio de inflamación para bloquear la respuesta inmune. Los esplenocitos de los ratones del grupo liMOG enfrentados al autoantígeno secretaron niveles elevados de IL-5 e IL-10, lo que sugiere la posible participación de las células Tr1 en el mecanismo de tolerancia inducido en nuestro modelo. Similarmente a lo observado en el modelo de diabetes autoinmune antes mencionado, las células Tr1 presentes en el bazo podrían estar evitando la migración de las células T efectoras a las áreas de inflamación en el SNC. Con todo, no podemos descartar la participación de las Treg, que podrían haber sido reclutadas en las áreas de inflamación en el SNC para suprimir localmente la actividad de las células efectoras o inducirles apoptosis. Ambos mecanismos podrían explicar la disminución en el porcentaje de células T en el infiltrado inflamatorio de los ratones del grupo liMOG.

La ausencia de quimerismo molecular en los ratones trasplantados con las células que expresaban liMOG indicaba que muy probablemente el beneficio terapéutico observado no era debido a los progenitores con capacidad de repoblación, ya que no se producía repoblación hematopoyética, sino por células sin capacidad de repoblación que expresaban el autoantígeno (ya que en los grupos control no se observó mejoría). Se ha descrito que la presentación de antígenos por parte de DC inmaduras, que pueden generarse *in vivo* tras la infusión de precursores mieloides inmaduros, puede inducir la diferenciación de células T reguladoras (Dhodapkar et al. 2001; Hawiger et al. 2001; Mahnke et al. 2003). Con el objetivo de caracterizar las poblaciones celulares que estábamos trasplantando, estudiamos el fenotipo de las células de MO sometidas durante 5 días a nuestro protocolo de transducción. Lo que observamos es que al final del cultivo la inmensa mayoría de ellas presentaban un

fenotipo mielóide ($Gr1^+$, $Mac1^+$), con apenas representación de otros linajes hematopoyéticos. Este fenotipo mielóide era todavía más frecuente si analizábamos exclusivamente las células que estaban expresando el vector retroviral, sin duda las responsables del efecto terapéutico observado. Por otra parte, la rapidez con que se comenzaba a observar el efecto terapéutico en los ratones del grupo liMOG (entre 2 y 16 días después de la infusión celular) era otra prueba en contra de una contribución significativa por parte de las células con capacidad de repoblación, ya que ésta no ocurre nunca antes de 5-7 días, incluso en ausencia de respuestas inmunes preexistentes. Con todos estos datos, los mejores candidatos para explicar la inducción de tolerancia tras el trasplante son, en nuestra opinión, los precursores mieloides o APC inmaduras generadas o derivadas del cultivo de MO, que presentarían el péptido antigénico de forma tolerogénica, probablemente induciendo la generación *in vivo* de diferentes poblaciones de células reguladoras (Fig. 46).

Además, la inducción de tolerancia en ausencia de quimerismo molecular y descartado éste como posible mecanismo tolerogénico, nos indujo a hipotetizar que la simple infusión, sin ningún acondicionamiento previo, de las células de MO transducidas sería suficiente para reproducir el mismo efecto terapéutico en ratones con EAE establecida. Usando el mismo protocolo pero obviando el tratamiento previo con busulfán, conseguimos reproducir los resultados obtenidos en animales acondicionados. Los ratones del grupo liMOG empezaron a mejorar de la enfermedad tempranamente, entre 2 y 5 días después de la infusión de células transducidas, como en los experimentos anteriores. Al eliminar la necesidad de acondicionamiento, este tratamiento es mucho menos tóxico y mejor tolerado por el receptor, que sólo recibe una infusión de sus propias células manipuladas *ex-vivo*. Debido a que las células transducidas son eliminadas *in vivo*, podría ser que la terapia no fuera eficaz a largo plazo, aunque este hecho lo desconocemos. En los experimentos en que hicimos un seguimiento clínico a largo plazo, el beneficio clínico se mantuvo en la mayoría de los ratones que mejoraron clínicamente tras el trasplante (durante los 3 meses de seguimiento) lo que sugiere que, al menos en este modelo, la tolerancia podría mantenerse a largo plazo. Nos hubiera gustado estudiar la susceptibilidad a la EAE en estos animales parcial o totalmente tolerizados tras la reinmunización con el péptido encefalitogénico. Por desgracia, esto no es posible dado que esta cepa de ratón, como la mayoría, sólo es susceptible a la enfermedad durante un determinado intervalo de tiempo (entre las 8 y 12 semanas de vida). Por otro lado, el hecho que no sea necesario el injerto de las células transducidas, reduce el riesgo de aparición de procesos malignos asociados a la integración del vector retroviral, ya que éstas son

literalmente eliminadas del organismo en un período de tiempo relativamente corto. Una vez comprobado que la terapia no mieloablativa es tan eficaz como la parcialmente mieloablativa, el hecho que las células responsables del efecto terapéutico sean rechazadas no supone una desventaja como podía parecer inicialmente. Contrariamente, este hecho aporta dos ventajas claras: por un lado se elimina la necesidad de acondicionamiento, reduciendo la potencial toxicidad del procedimiento y, por otro, elimina el riesgo de oncogénesis por inserción, asociado al uso de vectores integrativos (Hacein-Bey-Abina et al. 2003a; Hacein-Bey-Abina et al. 2003b; Cavazzana-Calvo et al. 2004; Modlich et al. 2005; Baum et al. 2006). La menor toxicidad y la reducción de riesgos asociados al tratamiento hacen que este protocolo se acerque más a una posible aplicación clínica para el tratamiento de enfermedades autoinmunes humanas. En el caso de la EM, una de las grandes limitaciones de esta estrategia terapéutica reside en el desconocimiento del antígeno o antígenos responsables de desencadenar la respuesta inmune. El tratamiento de pacientes afectados de EM con este tipo de terapia probablemente debería pasar por inducir tolerancia frente a todos o varios de los antígenos candidatos (MOG, PLP, MBP y MOBP principalmente). Por otro lado, la heterogeneidad en las moléculas del MHC que tenemos los humanos provoca que la respuesta inmune frente a autoantígenos sea dispar. Por ello, la inducción de tolerancia frente a múltiples péptidos podría solventar este hecho.

En resumen, la creación de quimerismo molecular en el sistema hematopoyético murino es una buena herramienta para inducir tolerancia específica en la mayoría de los ratones. Por otro lado, la terapia es también efectiva en presencia de una respuesta inmune previamente establecida, pudiendo mejorar la clínica de la EAE en la mayoría de los ratones tratados e incluso suprimiendo por completo la enfermedad. En el abordaje terapéutico, el injerto de las células de MO que expresan el péptido de la MOG₄₀₋₅₅ no es necesario, ya que se observa una mejoría clínica significativa aún cuando las células que expresan el autoantígeno han sido específicamente rechazadas. Creemos que este tipo de estrategia terapéutica merece ser explorada con más detalle, pues puede tener futuro en el tratamiento de enfermedades autoinmunes humanas, sobretudo para aquellas en las que el antígeno responsable es conocido, ya que es una terapia poco tóxica y antígeno específica.

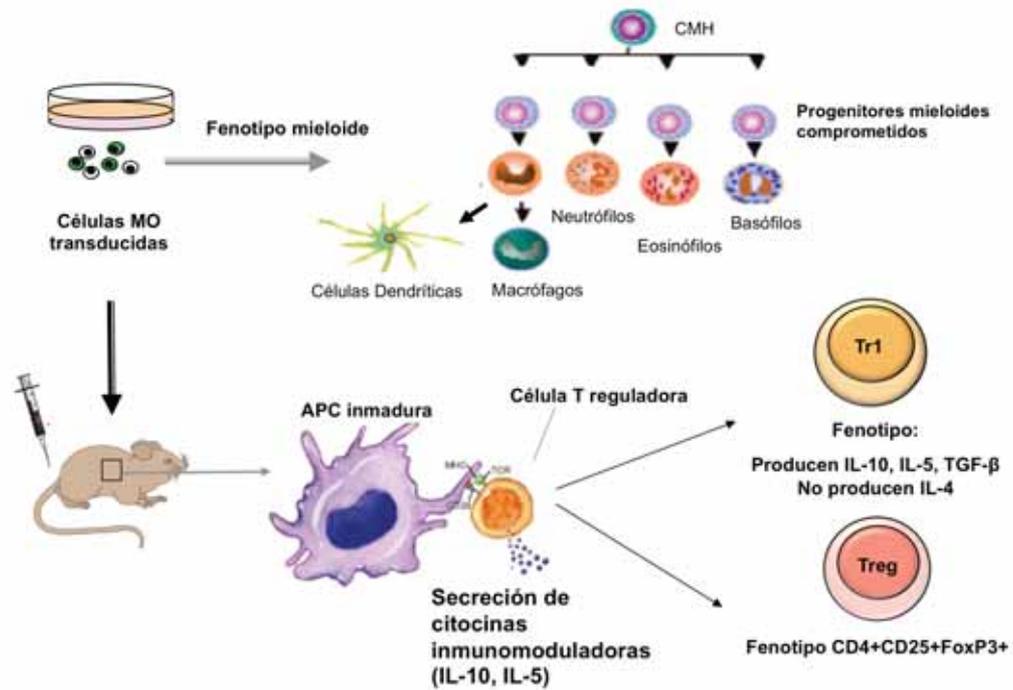


Fig. 46- Mecanismo de inducción de tolerancia propuesto para este modelo de EAE. Las células transducidas del cultivo de MO tienen, en su mayoría, un fenotipo mieloide. Las células que se trasplantan a los ratones donantes contendrían o darían lugar a APC inmaduras, que presentarían el péptido antigénico en condiciones tolerogénicas. Los niveles elevados de IL-10 e IL-5 hallados en el bazo de los ratones tratados con el autoantígeno nos sugieren la participación de las células Tr1 en el mecanismo de tolerancia periférica inducido en nuestro modelo, aunque no podemos descartar la participación de las células Treg, que podrían hallarse en el SNC suprimiendo la respuesta inflamatoria.

PARTE II. INFLUENCIA DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DEL TRANSGÉN EGFP EN LA INMUNOGENICIDAD DE LAS CÉLULAS TRANSDUCIDAS

Esta parte del trabajo surgió a partir de los experimentos de prevención de la EAE, en los que usamos el vector SF1-EGFP como control. En estos animales no detectamos células transducidas en los receptores tres semanas después del trasplante, a pesar de que casi todos ellos tenían quimerismo del donante. Por otro lado, el hecho que los ratones trasplantados con el vector SF91-liMOG-IRES-EGFP, que a efectos prácticos sólo difería con el anterior en el menor nivel de expresión del transgén (EGFP) en las células transducidas, sí que tuvieran quimerismo molecular, nos hizo pensar en la posible existencia de un rechazo específico de las células que expresaban el vector SF1-EGFP. El vector SF91 es una versión mejorada del vector SF1, aunque la diferencia entre ambos vectores, optimizados para una elevada expresión en el compartimiento mielóide, es mínima (Hildinger et al. 1999). Tampoco se ha descrito ni tiene base científica la idea de que uno de estos dos vectores pueda transducir mejor que el otro determinadas subpoblaciones celulares, pues la especificidad en cuanto a las células diana viene determinada por la envuelta de la partícula viral utilizada, que en ambos casos era la misma (ecotrópica). Por esta razón descartamos razonablemente la posibilidad que las diferencias entre estos vectores retrovirales (SF1 y SF91) fueran la causa del rechazo observado en los receptores de células de MO transducidas con el vector SF1-EGFP. Por otra parte, en experimentos realizados anteriormente por nuestro grupo, se había utilizado este mismo vector pero usando ICT como acondicionamiento en lugar de busulfán (Puig et al. 2002). En los ratones trasplantados tras recibir ICT (entre 2 y 9 Gy), prácticamente en ningún caso se observó rechazo específico de las células transducidas. El porcentaje de éstas respecto a las células del donante se mantenía incluso en animales acondicionados con las dosis más bajas de ICT (2 – 3 Gy). Por otro lado, está descrito que el nivel de expresión del segundo transgén en los vectores bicistrónicos en los que se usa una secuencia IRES es menor respecto al del primer transgén (Flasshove et al. 2000). En nuestros experimentos, la MFI de las células de MO transducidas antes de trasplantarlas era significativamente superior cuando el vector usado era el SF1-EGFP (vector LTR) en comparación con el SF91-liMOG-IRES-EGFP (vector IRES). La posibilidad que la expresión forzada y ectópica de la li influyera en el riesgo de rechazo frente al producto del segundo transgén (EGFP) es difícil de sostener ya que en experimentos previos en nuestro laboratorio utilizando el vector SF1-EGFP y el vector SF91-hFVIII-IRES-EGFP también observamos el mismo fenómeno. Todos estos datos nos sugerían que, cuando se utilizaban pautas de acondicionamiento

parcialmente mieloablativas (y poco inmunosupresoras), el nivel de expresión del transgén podría ser determinante en la inducción de una respuesta inmune que lleve al rechazo de las células transducidas.

Realizamos una serie de experimentos en los que trasplantamos células de MO transducidas a ratones previamente acondicionados con dosis parcialmente mieloablativas de busulfán o de ICT. Usamos el vector SF1-EGFP (vector LTR), de alto nivel de expresión de EGFP, y el SF91-IiMOG-IRES-EGFP (vector IRES), de bajo nivel de expresión de EGFP, para transducir las células de MO que posteriormente se trasplantaron a los receptores. Aunque en diversos estudios de transferencia génica se ha descrito la aparición de respuestas inmunes frente a los productos de transgenes y frente a proteínas virales en diversos tejidos (Yang et al. 1994; Tripathy et al. 1996; Izembart et al. 1999; Fields et al. 2000; Sarkar et al. 2000; Aubert et al. 2002; Di Domenico et al. 2005), la aparición de respuestas inmunes en estudios experimentales o en protocolos de terapia génica aplicados al sistema hematopoyético son poco frecuentes. Aun así, hay autores que describen la inmunogenicidad de transgenes expresados en injertos hematopoyéticos en determinadas circunstancias y en distintos modelos animales, especialmente en animales grandes (perros y primates no humanos), incluso después de una mieloablación letal (Lutzko et al. 1999; An et al. 2000; Donahue et al. 2000; Rosenzweig et al. 2001; Morris et al. 2004). En el caso concreto de la EGFP, algunos autores han dudado de su capacidad inmunogénica cuando se expresa en el sistema hematopoyético, concretamente en la cepa de ratón C57BL/6J (Skelton et al. 2001). Sin embargo, se ha demostrado la capacidad de la EGFP para desencadenar una respuesta inmune (Stripecke et al. 1999) e incluso se han identificado los epítopes inmunodominantes en ratones de la cepa Balb/c (Gambotto et al. 2000) y C57BL/6J para las células CD8⁺ (Han et al. 2008). Con todo, varios autores han descrito la creación de quimerismo molecular expresando la EGFP en el sistema hematopoyético murino usando dosis no mieloablativas de ICT (Kang et al. 2001; Puig et al. 2002) y de busulfán (2 x 10 mg/kg) (Andersson et al. 2003b). En nuestros experimentos detectamos quimerismo molecular en los ratones que recibieron MO transducida con el vector IRES, previo acondicionamiento con dosis parcialmente mieloablativas de busulfán, pero no en los trasplantados con MO transducida con el vector LTR, que da lugar a niveles de expresión tres veces más altos de EGFP que el vector IRES. Pudimos determinar que se había desarrollado una respuesta celular en los ratones que se trasplantaron con células transducidas con el vector LTR pero no en los ratones que recibieron células transducidas con el vector

IRES. La frecuencia de esplenocitos productores de IFN- γ era significativamente superior en los ratones del grupo LTR, siendo la respuesta celular débil o nula en los ratones del grupo IRES. Además, la producción de IFN- γ tenía una relación directa con la expresión del transgén, ya que cuanto menor era la expresión de EGFP en las células EL4 (la línea celular singénica utilizada para la presentación del antígeno en los ensayos *in vitro*), menor era la frecuencia de células que producían esta citocina. Todo ello demostraba claramente que, en los injertos hematopoyéticos con células transducidas, existe un umbral en el nivel de expresión del transgén por encima del cual se desencadena una respuesta inmune. Dicho umbral puede variar en función de múltiples variables, como por ejemplo la susceptibilidad individual. Así, una elevada expresión de un transgén potencialmente inmunogénico ya sea debido a un número alto de copias por célula o al empleo de un promotor potente, puede desencadenar una respuesta inmune que conduzca al rechazo de las células transducidas del organismo.

En el caso de los ratones acondicionados con ICT, observamos que el 72,7% de los receptores del grupo LTR y el 100% del grupo IRES no rechazaron las células transducidas. Estos datos sugieren que, al menos en este modelo, una mínima inmunosupresión como la que proporciona una dosis de ICT de 3 Gy es suficiente para evitar el rechazo de las células que expresan EGFP, incluso cuando lo hacen a niveles altos. Por otro lado, el hecho que ratones sometidos a ICT rechazaran las células que expresaban la EGFP a niveles altos apoya la hipótesis del nivel de expresión como riesgo de rechazo inmunológico. De acuerdo con nuestros resultados, Doi y colaboradores (Doi et al. 2004) describieron la aparición de respuestas humorales frente a la EGFP cuando inyectaban directamente en la retina de conejos un vector lentiviral que codificaba para este transgén. Sin embargo consiguieron evitar la respuesta inmune aplicando una pauta de inmunosupresión transitoria (recibieron metilprednisolona, azatioprina y ciclosporina durante un mes), manteniendo los niveles de expresión a largo plazo de la EGFP en la retina de los conejos tratados aún después de retirar el tratamiento inmunosupresor. Aun así, en otros estudios en los que se usó la ICT como régimen de acondicionamiento (Rosenzweig et al. 2001) incluso a dosis letales (Morris et al. 2004), se detectó una respuesta citotóxica frente a la EGFP. La diferencia entre estos resultados podría ser debida a múltiples factores como la disparidad en el sistema MHC de los diferentes modelos animales (los trabajos de Rosenzweig y Morris utilizan dos especies distintas de primates no humanos), la vía de administración o el tejido diana. Desconocemos también el nivel de expresión de la EGFP en estos estudios, lo que podría ser un factor crucial para

determinar la potencial inmunogenicidad del transgén incluso en receptores sometidos a mieloablación letal.

La inmunosupresión también evitaría en gran medida la aparición de respuestas humorales, ya que la mayoría de los ratones tratados con ICT no desarrollaron anticuerpos anti-EGFP, a diferencia de los ratones acondicionados con busulfán, que desarrollaron anticuerpos en una mayor proporción. Aun así, en nuestro modelo, la presencia de anticuerpos anti-EGFP no se asoció a un mayor riesgo de rechazo de las células transducidas, ya que pese a desarrollar una respuesta humoral frente a la EGFP, hubo ratones que no rechazaron las células transducidas. En un modelo de trasplante en primates no humanos (acondicionados con 2,4 Gy), a pesar de que rechazaron las células transducidas con EGFP y de que se detectó citotoxicidad específica frente a la proteína, no se observaron respuestas humorales en todos los casos (Rosenzweig et al. 2001). Estos resultados indican que la detección de anticuerpos frente al producto de un transgén no siempre es una herramienta útil para determinar si ha habido rechazo inmunológico de las células transducidas con transgenes que codifican para proteínas que, como la EGFP, son intracelulares y por lo tanto desencadenan una respuesta T citotóxica (Stripecke et al. 1999; Rosenzweig et al. 2001). Sí podría ser relevante la detección de anticuerpos para predecir la sensibilización del sistema inmune frente al producto del transgén cuando se trata de proteínas que son secretadas al exterior de la célula, como es el caso del FVIII de la coagulación o de la α -L-iduronidasa (Shull et al. 1996).

Estos resultados tienen profundas implicaciones a la hora de elegir vectores y de diseñar y aplicar protocolos de terapia génica. En este campo tradicionalmente se han investigado y desarrollado estrategias y optimizado los vectores para aumentar la eficiencia de transducción y elevar el nivel de expresión de los transgenes, pero no se ha prestado la suficiente atención a las posibles consecuencias e implicaciones inmunológicas de la introducción de transgenes que codifican para proteínas que en muchos casos son “nuevas” para los pacientes que se someten a los ensayos clínicos. Es muy probable que algunos ensayos de marcaje o de terapia génica, experimentales o clínicos, especialmente los que se realizaron durante los primeros años de la terapia génica, hayan fallado debido a respuestas inmunes que no fueron analizadas. En el caso, por ejemplo, de enfermedades hereditarias como las hemofilias o la enfermedad granulomatosa crónica se requiere un nivel mínimo de expresión del transgén para obtener un beneficio terapéutico. En las enfermedades hereditarias se introducen copias funcionales del gen mutado en células o tejidos diana del propio paciente y en

el caso del sistema hematopoyético esto debe realizarse en el contexto de un trasplante utilizando células hematopoyéticas autólogas transducidas *ex vivo*. Por esa razón, para la terapia génica de enfermedades hereditarias que afectan al sistema hematopoyético o que se sirven de él para expresar transgenes terapéuticos, los pacientes deben recibir regímenes de acondicionamiento parcial o totalmente mieloablativos, que, como ya se ha comentado anteriormente, son tóxicos y se produce una elevada morbilidad. Por ello, se han investigado pautas mínimamente mieloablativas, que en determinadas situaciones pueden ser eficaces (Aiuti et al. 2002). No es casualidad que los dos primeros grandes éxitos de la terapia génica se hayan producido en dos formas de inmunodeficiencia severa combinada (la ligada al cromosoma X y la deficiencia de ADA), en las que la incapacidad para generar una respuesta inmune eficaz (y por tanto para rechazar células hematopoyéticas transducidas) y la ventaja selectiva de las células modificadas genéticamente, hacen casi innecesarias la mieloablación y la inmunosupresión. Así, en el caso de la SCID-X1, los pacientes no reciben acondicionamiento alguno (Cavazzana-Calvo et al. 2000) y en la deficiencia de ADA, basta utilizar una dosis no ablativa de busulfán (4 mg/Kg), que suele ser bien tolerada, para que se produzca la reconstitución inmune. Aunque el sistema hematopoyético tenga la capacidad de crear tolerancia *per se*, una característica que lo hace único, siempre se debe tener en cuenta la potencial inmunogenicidad de los transgenes que se introducen *de novo*, especialmente en contextos de mieloablación parcial con poca o nula inmunosupresión y cuando se usan vectores que producen altos niveles de expresión. Los pacientes con mutaciones que conllevan el déficit total de una proteína (grandes deleciones o mutaciones *non sense*) que se sometan a terapia génica son firmes candidatos a desarrollar respuestas inmunes frente al producto del gen terapéutico, lo que conllevaría el fracaso de la terapia. Además, otra consecuencia gravísima de una sensibilización frente al producto de un transgén terapéutico es que vetaría o complicaría enormemente la posibilidad de aplicar posteriormente una nueva terapia génica o incluso de realizar tratamientos substitutivos, en el caso de que estén disponibles. Por dicha razón, cada paciente debe ser estudiado individualmente y, en los casos de mayor riesgo, considerar el empleo de pautas de inmunosupresión transitoria para prevenir la sensibilización, pautas que deben ser adecuadamente investigadas. Además, a raíz de los resultados obtenidos en el presente estudio, en los casos en los que no se requiera un alto nivel de expresión del transgén para rescatar la función a nivel de célula, proponemos que en el diseño de los ensayos clínicos se incluyan los estudios inmunológicos pertinentes y se considere, en las situaciones que lo requieran, el uso de vectores con promotores débiles y la limitación en el número de copias del

vector por célula, con el fin de reducir al mínimo el riesgo de una eventual sensibilización.