

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Facultat de Veterinària

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia



TESIS DOCTORAL

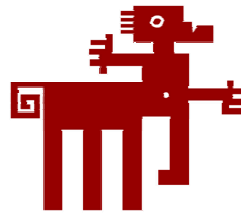
CAROLINA ROMERO PRADA

Bellaterra, mayo 2011

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Facultat de Veterinària

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia



Memoria presentada por la Lda. en Veterinaria **CAROLINA ROMERO PRADA**
para optar al grado de Doctor dentro del programa de Doctorado en Inmunología

Tesis dirigida por la Doctora

ESTER FERNÁNDEZ GIMENO

Bellaterra, 6 de mayo 2011



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia
Unitat de Fisiologia Animal (Veterinària)

ESTER FERNÁNDEZ GIMENO, Profesora Titular del Departament de Biologia Cel·lular,
de Fisiologia i d'Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

Certifica:

Que la memoria titulada: *"TOWARDS GENE THERAPY OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE: QUESTIONS AND ANSWERS IN MURINE MODELS"* presentada por la Licenciada en Veterinaria CAROLINA ROMERO PRADA ha sido realizada bajo su dirección y reúne los requisitos necesarios para ser defendida y optar al grado de Doctor.

Y, a los efectos legales, firma la siguiente constancia en

Bellaterra, a 6 de mayo de 2011

Dra. Ester Fernández Gimeno

*Mi infancia vuelve a mi memoria
En un día frío y gris,
Y todos los recuerdos hoy latentes
Se concentran sólo en ti.*

*Iluminabas mi camino
A cada paso que di.*

*Hoy sólo pienso una cosa:
Si algún día soy abuela
Quiero parecerme a ti.*

A mi queridísima pequeña familia

Agradecimientos

Aún recuerdo los primeros días al empezar el doctorado en los que pensaba 'bufff, ¿cuatro años más estudiando...?'. Y al final, ha sido alguno más, pero me alegro de la decisión que tomé y no cambiaría un solo día de esta maravillosa experiencia... que bien podría haberse llamado 'La Historia Interminable', pero ya se sabe, todo llega, el tiempo pasa y hoy, al fin, consigo cerrar este 'gran capítulo' de mi vida para abrir otros muchos, que deseo sean como mínimo igual de gratos. Son tantos los buenos momentos, las cosas aprendidas, y tantas las personas que, de una forma u otra, han sido partícipes, que espero no olvidarme de ninguna. De antemano me disculpo por si eso pasara.

En primer lugar, gracias especialmente a la Dra. Ester Fernández Gimeno por introducirme en el apasionante y complejo mundo de la Investigación, y darme esta grandísima oportunidad. Gracias Ester por tu ayuda, tener siempre tu puerta abierta para mí, por las magníficas correcciones, así como el apoyo, la confianza, el gran interés y motivación demostrados siempre en la dirección del proyecto y de esta tesis doctoral. ¡Gracias por todo!

Para la realización de los experimentos contenidos en esta memoria hemos recibido financiación de diversas entidades. Los resultados recogidos en los capítulos 1, 3 y parte de los que se reflejan en el capítulo 4 han sido financiados a través de los proyectos Marató de TV3 (031630, 031631, 031632, 031633). Holding Grifols, a través de un convenio de investigación establecido con la UAB, ha contribuido a la financiación de los estudios recogidos en el capítulo 2. A todos ellos quiero expresar mi agradecimiento. Además, agradecer también las becas predoctorales obtenidas, de Formación de Personal Investigador (FPI, 2005) de la Universitat Autònoma de Barcelona y de Formación de Personal Universitario (FPU, 2007) del Ministerio de Educación y Ciencia, que también lo han hecho posible.

Este trabajo es el fruto de colaboraciones con diversas instituciones; doy las gracias a las personas que han contribuido y lo han hecho posible:

En la **Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol (Can Ruti)**, gracias al Dr. Adolfo Río por tu apoyo, tu rigor científico, tu ejemplo de precisión y meticulosidad en el trabajo, y por confiar en mi aún hoy en día! Gracias a Aída Raventós, por toda la ayuda que me has brindado, por el interés que siempre demuestras y por los momentos compartidos (con o sin estrés). ¡Estoy muy contenta de trabajar con vosotros actualmente en este gran proyecto que es Nanotherapix! Al Dr. M.A. Gassull, Dr. J. Manyé, Marco Fdez. y los demás compañeros de Can Ruti: Laura, Sonia, Neus, Eva, Ana, Alba, Sara, Marian, Gerard, José María -JM el 'solete-matamoscas'© ¡Gracias por la portada, gracias por todo! ¡Eres un encanto!- y Eugeni -por hacerme reír tanto, por la cantidad de detalles, dibujos para colorear ☺ y un largo etc.- ¡Necesitaría una página entera para tod@s!

En el **CBATEG** al Dr. Miguel Chillón por tu gran simpatía, ayuda y grandes conocimientos, y porque sin tu colaboración esta tesis podría haber sido 'muuuuy laaarga'. Gracias a Ester Rodríguez por compartir horas en el estabulario y el laboratorio y por los adenovirus quiméricos.

En **Belloitge**, gracias al Dr. José Carlos Perales, por tu simpatía, los buenos consejos y las charlas sobre ciencia. Gracias en especial a Sandra Milena (mi 'colombiana mala') por tu alegría, conocerme y comprenderme tan rápido, compartir taaaantas cosas conmigo, llevarme a comer unos durums riquísimos en la ramblita de Belloitge los días de PCR's ☺ y porque sin ti, ¡el cuarto capítulo de esta tesis no hubiera sido posible! ¡Gracias por ser cada día una gran Amiga! ¡Y Felicidades Doctora!

Gracias también a los miembros del **Parc Científic de Barcelona** del grupo del Dr. Ramón Eritja, por el costoso pero acertado diseño de las modificaciones químicas de los siRNA's y gracias por la enorme confianza que ha demostrado siempre en el proyecto.

En la **Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)**, multitud de personas de diferentes departamentos a la que agradecer por diversos motivos:

A los miembros del **Servei Estabulari de la UAB** (Jordi Cantó, Rafi, Matías, Carlos, Juan Ramón, etc.) por el soporte proporcionado. Gracias Javier Benito (espero que por fin sepas lo que es el descanso), Paco, Sandra y Nacho por toda la ayuda y los momentos compartidos.

Gracias a Blanca y Aída de la **Unitat d'Histologia i Anatomía Patològica** de la Facultat de Veterinària por estar siempre disponibles, realizar un estupendo trabajo en el procesamiento de los cortes histológicos (¡que han sido muchos!) y por el asesoramiento.

Gracias a María dels Àngels Calvo y los demás miembros del **Àrea de Sanitat Animal** de la Facultat de Veterinaria, además de por su gran amabilidad, por el laborioso trabajo con los cultivos bacterianos y el valioso asesoramiento.

A los miembros del **Institut de Biotecnologia i Biomedicina (IBB)**, Fran, Paqui, Bea y Álvaro por introducirme en el maravilloso mundo de los cultivos y por toda la ayuda brindada durante esos 'arduos' meses de iniciación.

Al personal de la **Unitat de Fisiologia Animal de la Facultat de Veterinària** donde he llevado a cabo casi la totalidad de experimentos de la tesis: A los Drs. Maite Martín, Marcel Jiménez y Patri Vergara por vuestra simpatía y los momentos compartidos. Gracias a David, por llevar a cabo tu labor administrativa siempre con simpatía y buen humor, incluso en los momentos más caóticos. Pepe, gracias por las veces que me has ayudado en temas administrativos. Gracias a Antonio; resultas indispensable en muchas ocasiones para el buen funcionamiento de los laboratorios. A Pere (Farmacología) por haberme salvado en más de una ocasión de algún que otro problemilla técnico.

A los 'habitantes del 115': Emma, Bego, Álvaro y Claudia por los momentos compartidos, las risas y disputas con la paella de Bego y las divertidas charlas durante la comida para 'tratar de desconectar'.

A todos los compañeros de Fisiología que compartieron sus años de Tesis / Master conmigo:

En primer lugar, Gloria, por ser una Amiga, saber escuchar, por tus consejos y por convertir los malos en buenos momentos con sólo una sonrisa. Gracias por seguir ahí, y por continuar apoyándome. A Esther Jorge, por compartir tus años de tesis conmigo desde nuestro primer día. ¡Gracias por las lecciones de cocina japonesa! Estefanía, por tu apoyo, simpatía y por ser un ejemplo de fortaleza y valentía. Mariona y Anna D. gracias por todos los momentos compartidos y por los consejos. Anna, es war toll mit dir auf Deutsch zu sprechen! A Lina, por tus bonitos detalles (gracias por la rosa para mi tesina, ¡no lo olvidaré nunca!) y por tu serenidad en todo momento. A Mónica, Yoli, Hernán ('el company') y Alicia por todos los momentos compartidos.

Y a los que aún siguen 'rondando' por Fisiología: A Diana, por ser la primera en recibirme con una sonrisa, por tu apoyo y el gran interés que siempre demuestras. A Joan B (Big J), por toda tu ayuda y sabios consejos científicos, tu amistad, todos los momentos compartidos, las charlas 'monotemáticas' -ejem, ejem- durante la comida, en los trayectos en MI coche, etc., por hacerme reír, pero sobre todo por ser un gran compañero. A Víctor, por tus bromas y chistes (a veces muy malos, pero siempre 'en tu línea'), por las canciones de Serrat et al. (eso no sé si lo echaré de menos...jejeje) y por tus sabios consejos científico-

informáticos. A Joan A y Ferrán (los inseparables) por todos los momentos compartidos y la 'alegría a la feina'. A Mónica y Miriam, no hemos coincidido mucho, pero gracias por los momentos compartidos. Elena, lo mismo te digo; seguro que todo te va a ir muy bien y espero que disfrutes mucho de la tesis (que 'se pasa volando') y de mi ex-sitio☺.

A Mónica Comalada. Gracias por compartir tus conocimientos científicos y experiencia conmigo, por tu gran ayuda en el laboratorio y en cultivos, tu amistad, tus consejos y ánimos, y por dejarme seguir contando contigo, aún hoy en día. Y por supuesto... ¡¡muchísimas felicidades por Jana!!

No puedo olvidarme de mis ratoncitos, que pese a todo, poco se han quejado...¡¡Gracias!!

A los **Amigos** que, desde la distancia o desde cerca, siempre me han apoyado: Marga, mi primera y gran Amiga en Barcelona desde los tiempos de la Vila, ya hace más de 12 años; desde entonces, hemos compartido tanto, ¡tanto!, y aún no te has cansado de mi... ☺ ¡¡Gracias!! ¡¡¡Ánimo con todo... eres una persona maravillosa!!! ¡Te quiero mucho! A Maribel (mi Mamibel), desde la carrera y afortunadamente aún hoy en día puedo seguir contando con tu compañía, 'sin cuestionar nuestra amistad'☺.

Gracias a Pepi, Juanjo, Judit y Jordi, Ester, Juanjo y Lucía, Palmira, Francisco y Rosa, Pepa y Juan... por los 9 años compartidos y por ser como mi segunda familia. Mil gracias. ¡Nunca os olvidaré!

Dejo para el final lo más importante para mí: **Mi Familia**.

Gracias a mi madre, no sólo por haberme dado la vida, sino por habérmelo dado TODO. Siempre has sido un Pilar fundamental para mí, y porque sin ti, tus incesantes ánimos, tu confianza plena en mí y tu ayuda incondicional en todo momento, jamás hubiera sido lo que soy ahora. ¡Te quiero! ¡No lo olvides nunca! Eres la mejor madre y amiga del mundo.

Gracias, especialmente, a mi queridísima abuela. Tata, lo has sido todo para mí; el problema fue darme cuenta demasiado tarde de lo imprescindible que eras en mi vida y de lo muchísimo que te iba a echar de menos, para haber podido valorarte y demostrártelo más de lo que lo hice...espero y deseo que fuera suficiente para ti... Estés donde estés, sé que te sentirás contenta y orgullosa. ¡Nunca olvidaré nuestro último vuelo en Tenerife, las tres juntas! Te quiero.

He de reconocer, que casi me olvido de ti: Tú, que no creo que leas esto jamás... en el fondo te doy las gracias, también me has dado la vida, y con ella, coraje y fuerza para ser lo que soy ahora.

Obviamente estos agradecimientos tenían que tener un lugar también para ti (aunque sean los que más me han costado); tú que has vivido toda esta tesis en primerísima persona... Dani, casi 9 años con momentos buenos (buenísimos, ¡¡que jamás olvidaré!!) y otros no tan buenos ("Saber olvidar, más es dicha que arte"...pero aún casi todo me recuerda a ti). Hace mucho tiempo empezaste a escribir Nuestra Historia... No sé qué nos depara 'el futuro', ni sé qué es lo mejor para los dos, pero me gustaría saber cómo acaba realmente esa historia. A veces lo que más deseas, nunca se cumple y, en cambio, lo que menos esperas que suceda, ocurre... y, a veces conoces a cientos de personas y ninguna te deja huella, y de pronto conoces a una y te cambia la vida, para siempre... Dicen que 'una pérdida se cura mediante dos grandes remedios: la distancia y el silencio'... By now, I'm living 'One day at a time'. 'Seize the day'...

Gracias a tod@s,

Carolina Romero Prada
Sabadell, 1 de mayo 2011

***'Erfolge in der Forschung benötigt vier Gs:
Glück, Geduld, Geschick und Geld'***

*('Success in research needs four Gs:
Luck, patience, skill and money')*

'If the first three are present and used properly the fourth comes by itself'

- Paul Ehrlich (1854-1915)

Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1908



Índice

ÍNDICE

Abreviaturas	i-iii
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
1. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL (IBD)	3
1.1 Aspectos generales	3
1.2 Enfermedad de Crohn <i>versus</i> Colitis Ulcerosa	4
1.3 Epidemiología	5
1.4 Etiología y fisiopatología	5
1.5 Factores predisponentes	6
1.5.1 Factores genéticos	6
1.5.2 Factores inmunológicos	7
1.5.2.1 INMUNIDAD INNATA: Receptores Toll-like e IBD	10
1.5.2.2 INMUNIDAD ADAPTATIVA: células T y células B	12
1.5.2.3 Patrón de citocinas en IBD	14
1.5.3 Factores ambientales	15
1.6 Tratamientos actuales de IBD	16
1.7 La citocina anti-inflamatoria IL-10	18
1.8 La citocina pro-inflamatoria TNF α	21
2. MODELOS EXPERIMENTALES DE IBD EN ROEDORES	24
2.1 Modelos inducidos químicamente	24
2.1.1 Colitis inducida por sodio dextrano sulfato	25
2.2 Modelos de colitis inducidos genéticamente	27
2.3 Modelos de colitis espontánea	27
2.4 Modelos de transferencia celular	27
2.5 CD1 <i>versus</i> BALB/c <i>versus</i> C57BL/6	28
2.6 Paradigma de elección	29
3. TERAPIA GÉNICA	30
3.1 Terapia génica y vectores	30
3.1.1 Vectores virales: Adenovirus	31
3.1.2 Adenovirus de primera, segunda y tercera generación	33
3.1.3 Efectos adversos de los Ad	34
3.1.4 Alternativas para disminuir los efectos adversos	36
3.2 Terapia génica no viral: Plásmidos	38
3.2.1 Administración hidrodinámica de pDNA's	39
3.2.2 Factores críticos de la administración hidrodinámica de pDNA's	41
3.2.3 Factores limitantes de los pDNA's en terapia	41
3.2.4 Estrategias para disminuir las propiedades inmunoestimuladoras	43
3.3 Terapia génica no viral: siRNA's	44
3.3.1 Mecanismo de acción de RNAi y diseño de siRNA's	45
3.3.2 Aplicaciones de RNAi	48
3.3.3 Modificaciones químicas de siRNA's	48
3.3.4 Vías de administración de siRNA's	49
3.3.5 RNAi e inmunidad	49
3.3.6 siRNA's y efectos off-target	51
REFERENCIAS	53

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 69

RESULTADOS 71-189

CAPÍTULO 1: ‘*THERAPEUTIC EFFICACY OF SYSTEMIC IL-10 IN COLITIS: ADVANTAGES OF CPG-FREE PLASMIDS VERSUS VIRAL VECTORS*’

ABSTRACT 71

INTRODUCTION..... 72

MATERIALS AND METHODS 73

Animals 73

Preparation of plasmids and adenoviral vectors 73

DSS-induced colitis and vector administration 73

Time course of DSS-induced colitis and Clinical Score..... 75

Euthanasia and tissue collection..... 75

Histological analysis..... 75

Myeloperoxidase (MPO) activity..... 76

ELISA assay of murine IL-10 and murine Serum Amyloid A (SAA)..... 76

Statistical analysis..... 76

RESULTS 77

Administration of 3% DSS in C57BL/6 mice induced a mild-moderate ‘chronic’ colitis 77

Ad5 and plasmid carrying the IL-10 gene ameliorate DSS colitis..... 77

DISCUSSION 89

REFERENCES..... 92

CAPÍTULO 2: ‘*IMPACT OF IL-10 IN THE HOST IMMUNE RESPONSES TOWARDS ADENOVIRAL VECTOR READMINISTRATIONS*’

ABSTRACT 95

INTRODUCTION..... 96

MATERIALS AND METHODS 98

Animals..... 98

In vivo adenoviral administration 98

Euthanasia and splenocyte culture 99

Splenocyte stimulation and Ag-specific T and B cell proliferation assays..... 99

Cytokine and Immunoglobulin assays 100

Control sera, target cells and adenoviruses for Ad neutralization assays 100

Anti-Ad neutralization antibody (anti-AdNab) assay..... 100

Viability assay 101

Statistical analysis..... 101

RESULTS 102

Influence of Ad5IL-10 and Ad5GFP administration regime on splenocyte proliferative capacity.....102

Humoral response to repeated administration of Ad5 carrying IL-10 or GFP..... 104

Influence of Ad5IL-10 and Ad5GFP administration regime on cytokine release..... 105

DISCUSSION 116

REFERENCES..... 122

CAPÍTULO 3: 'BIOSAFETY AND BIODISTRIBUTION OF CHIMERIC ADENOVIRUSES TO THE GASTROINTESTINAL TRACT: A NEW APPROACH TO SELECTIVE GENE DELIVERY TO THE INTESTINE'

ABSTRACT	127
INTRODUCTION	128
MATERIALS AND METHODS	130
Animals.....	130
Adenoviral vectors	131
Evaluation of clinical colitis, euthanasia and tissue collection	131
Beta-galactosidase immunohistochemistry.....	132
Chromogranin-A, Somatostatin and CD68 immunofluorescences	133
Luminometric analysis	133
Myeloperoxidase (MPO) activity.....	134
Microbiological controls in tissues of healthy and colitic mice	134
Statistical analysis.....	135
RESULTS	136
Biosafety of chimeric adenoviruses in healthy animals.....	136
Biodistribution pattern of chimeric adenoviruses in healthy animals	136
Biosafety and biodistribution pattern of chimeric adenovirus in colitic animals.....	146
Microbiological control studies in tissues of healthy and colitic mice	148
DISCUSSION	150
REFERENCES	153

CAPÍTULO 4: 'FUNCTIONALLY ENHANCED siRNA TARGETING TNF α ATTENUATES DSS-INDUCED COLITIS AND REDUCES TLR-MEDIATED IMMUNOSTIMULATION'

ABSTRACT	155
INTRODUCTION	156
MATERIALS AND METHODS	158
Preparation of chemically modified siRNAs	158
Silencing ability in vitro	158
Isolation of murine peritoneal macrophages.....	159
Animals	159
DSS-induced colitis and clinical evaluation	159
siRNA treatment protocol	159
Euthanasia and tissue collection.....	161
Histological analysis.....	161
Myeloperoxidase (MPO) activity.....	161
Real time RT-PCR (qRT-PCR) analysis.....	162
Measurement of TLR3, TLR7 and TLR8 activation: qRT-PCR IFN- β and IFIT-1 (IFN- α).....	162
Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolation, culture and transfection with siRNAs... ..	163
ELISA assay of murine TNF α and murine Serum Amyloid A (SAA)	163
Microarray analysis of gene expression.....	163
Statistical analysis.....	164
RESULTS	165
siTNF78 showed significant TNF α silencing in vitro	165
Intrarectally delivered siTNF78 ameliorated experimental DSS colitis at day 5	166
Intrarectally delivered siTNF78 ameliorated experimental DSS colitis at day 8	171
Intrarectally delivered siTNF78 exhibited TNF α mRNA silencing in colon	174
Intrarectally delivered siRNA TNF α did not reduce TNF α protein levels in serum	174
Chemical modifications result in reduced innate immune system activation	175
Correlation analysis.....	177

<i>Gene array analysis in colitic mice treated with different siRNAs against TNFα</i>	178
1.- <i>Pathways differentially enriched by siTNF78</i>	180
2.- <i>Chemical modifications result in reduced innate immune response</i>	181
DISCUSSION	182
ACKNOWLEDGEMENTS	186
REFERENCES	186
DISCUSIÓN GENERAL	191
1.- <i>Terapia génica gastrointestinal</i>	191
2.- <i>IL-10 como molécula terapéutica</i>	192
3.- <i>Terapia génica con IL-10</i>	193
4.- <i>Efecto de la IL-10 sobre la eficacia de las readministraciones del vector terapéutico adenoviral</i>	196
<i>Ad5 IL-10 como terapia de la IBD</i>	197
5.- <i>Estudios de biodistribución y bioseguridad adenoviral</i>	198
6.- <i>Silenciación de TNFα (siRNA anti-TNFα) como estrategia terapéutica</i>	201
7.- <i>Necesidad de una terapia local combinada para la IBD</i>	205
REFERENCIAS	208
CONCLUSIONES GENERALES	215
ANEXOS	217
<i>Índice de tablas y figuras</i>	217
<i>Índice de reactivos</i>	223
<i>Esquema de células y moléculas</i>	227
<i>Publicaciones</i>	229

Abreviaturas

Ab	Anticuerpo, <i>Antibody</i>
Ad	Adenovirus
Ad40	Adenovirus 40
Ad40 wt	<i>Wild type Ad40</i>
Ad5/40	<i>Chimeric Ad 5/40</i>
Ad5/40S, Ad40S	<i>Chimeric Ad 5/40S, Ad5 virion that encodes the short Ad40 fiber</i>
Ad5IL-10	<i>Adenovirus 5 encoding the IL-10 gene</i>
Ad5mIL-10	<i>Adenovirus 5 encoding the murine IL-10 gene</i>
Ad5wt	Adenovirus salvaje, <i>Wild type Ad5</i>
AdGFP	<i>Adenovirus encoding the GFP reporter gene</i>
Ag	Antígeno, <i>antigen</i>
ALT	<i>Alanin aminotransferase</i>
anti-AdNAb	Anticuerpo neutralizante anti-adenovirus, <i>anti-adenovirus neutralizing antibody</i>
APC	Célula presentadora de antígeno, <i>Antigen-presenting cell</i>
ASCA	Anticuerpo anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
AST	<i>Aspartic aminotransferase</i>
CAR	Coxsackie Virus y receptor de Ad, <i>Coxsackievirus and Adenovirus Receptor</i>
CARD	Dominio de activación y reclutamiento de caspasas, <i>caspase activation and recruitment domain</i>
CD	Enfermedad de Crohn, <i>Crohn's disease</i>
CFU	Unidad formadora de colonias, <i>Colony Forming Unit</i>
Chr-A	Cromogranina A, <i>Chromogranin-A</i>
CMV	Citomegalovirus, <i>Cytomegalovirus</i>
ConA	Concanavalina A, <i>Concanavalin A</i>
CpG	Citosina poli-Guanina, <i>Cytosin poli-Guanin</i>
CTL	Linfocito T citotóxico
DAI	Índice de actividad de la enfermedad, <i>Disease activity index</i>
DC	Célula Dendrítica, <i>Dendritic cell</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, <i>Desoxyribonucleic acid</i>
DOTAP	<i>N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methylsulfate</i>
dpm	Desintegraciones por minuto, <i>counts per minute</i>
dsRNA	RNA de cadena doble, <i>doble-stranded RNA</i>
DSS	Sodio Dextrano Sulfato, <i>Dextran Sulphate Sodium Salt</i>
E1	Región temprana 1 adenoviral, <i>Early region 1</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	Proteína quinasa regulada por señales extracelulares, <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FBS	Suero fetal bovino, <i>fetal bovine serum</i>

GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GFP	Proteína verde fluorescente, <i>Green Fluorescent Protein</i>
HS	Score histológico, <i>Histological score</i>
huIL-10	Interleucina 10 humana, <i>human IL-10</i>
i.p.	Intraperitoneal
i.r.	Intrarectal
i.v.	Intravenoso
IBD	Enfermedad Inflamatoria Intestinal, <i>Inflammatory Bowel Disease</i>
IC₅₀	<i>Fifty percent inhibitory concentration</i>
IEC	Célula epitelial intestinal, <i>Intestinal epithelial cell</i>
IFIT-1	<i>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1</i>
IFN	Interferón, <i>Interferon</i>
Ig	Inmunoglobulina, <i>Immunoglobulin</i>
IL	Interleucina, <i>Interleukin</i>
IL-10rhu, rhuIL-10	Interleucina 10 recombinante humana, <i>Recombinant Human IL-10</i>
IU	<i>Infectious Unit</i>
KO IL-10	<i>IL-10 knock-out</i>
KO IL-10R	<i>IL-10 Receptor Knock-out</i>
KO, -/-	<i>Knock-out</i>
LacZ	<i>E. coli β-galactosidase</i>
LB	<i>Lysis Buffer</i>
Lipoplex	Plásmido conjugado con policationes
LPMC	Célula mononuclear de lámina <i>propria</i>
LPS	Lipopolisacárido, <i>Lipopolysaccharide</i>
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos, <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
MDR1	Gen de multiresistencia a fármacos, <i>Multidrug resistance 1</i>
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad, <i>Major histocompatibility complex</i>
mIL-10	IL-10 murina, <i>Murine IL-10</i>
miRNA	Micro RNA (RNA monocatenario de 21-25 nucleótidos)
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MPO	Mieloperoxidasa, <i>Myeloperoxidase</i>
mRNA	RNA mensajero, <i>Messenger ribonucleic acid</i>
NFκB	Factor de transcripción nuclear <i>kappa B</i> , <i>Nuclear factor kappa B</i>
NK	Célula asesina natural, <i>Natural killer cell</i>
NOD2	Dominio de oligomerización de nucleótidos 2, <i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
p.o.	Oral
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos, <i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
p-ANCA	Anticuerpo anti-citoplasma de neutrófilo con patrón perinuclear

PBMC	Célula mononuclear de sangre periférica, <i>Peripheral-blood mononuclear cell</i>
PBS	Solución salina tamponada con fosfato, <i>Phosphate-buffered Saline</i>
PBT	<i>Phosphate-buffered Saline + 0,5% BSA + 10% Triton X100</i>
pDNA, Pl	DNA plasmídico, <i>Plasmid</i>
PI/IL-10	Plásmido codificante del gen de la IL-10, <i>Plasmid encoding the IL-10 gene</i>
PP	Partícula física, <i>physical particle</i>
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones bacterianos, <i>pattern recognition receptors</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative (real time) reverse transcription polymerase chain reaction</i>
RGAD	<i>Tetrapeptide Arg-Gly-Ala-Asp</i>
RGD	<i>Tripeptide Arg-Gly-Asp</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RLU	<i>Relative Luminescent Units</i>
RNA	Ácido Ribonucleico, <i>Ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA de interferencia, <i>RNA interference</i>
SAA	Proteína sérica amiloide A, <i>Serum Amyloid A</i>
SCID	Inmunodeficiencia Severa Combinada, <i>Severe combined Immunodeficiency</i>
siRNA	Fragmentos cortos de RNA de interferencia, <i>Short interference RNA</i>
siScr	<i>Scrambled siRNA sequence</i>
siTNF78	<i>siRNA TNFα with 2'-OMethyl and popanediol modifications in the sense strand</i>
siTNF	<i>siRNA TNFα chemically unmodified</i>
siTNF-OMe	<i>siRNA TNFα with 2'-O-Methyl modification in the sense strand</i>
SSF	Suero salino fisiológico, <i>Physiologic Saline Serum</i>
ssRNA	RNA de cadena sencilla, <i>Single stranded ribonucleic Acid</i>
STAT	Transductor de señales y activador de la transcripción, <i>signal transducer and activator of transcription</i>
TCR	Receptor de célula T, <i>T cell receptor</i>
TGFβ	Factor de crecimiento transformante β , <i>transforming growth factor β</i>
T_H CD4⁺	Linfocito T <i>helper</i> CD4 ⁺
TLR	Receptor <i>toll-like</i> , <i>toll-like receptor</i>
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfónico, <i>2,4,6-trinitrobenzene sulfonic azid</i>
TNFα	Factor de necrosis tumoral α , <i>Tumor Necrosis Factor α</i>
Tr, Treg	Célula T reguladora
UC	Colitis Ulcerosa, <i>Ulcerative colitis</i>
vIL-10	IL-10 viral, <i>Viral Interleukin 10</i>



Resumen

Resumen

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (IBD) hace referencia a un grupo de patologías heterogéneas, multifactoriales, de elevada prevalencia mundial y alto impacto socioeconómico que afecta al tracto gastrointestinal causando inflamación crónica de diferentes tramos del intestino, y que cursa con dolor abdominal, pérdida de peso, diarrea, hematoquecia, etc. además de múltiples síntomas extraintestinales. La falta de un tratamiento curativo genera la necesidad de búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas, entre las cuales, la terapia génica ofrece expectativas prometedoras.

La introducción de ácidos nucleicos (DNA o RNA) en células diana con la intención de aumentar o disminuir la expresión de un gen específico durante un periodo de tiempo prolongado, así como el desarrollo de vectores de terapia génica, eficaces y seguros, se vislumbran como objetivos prioritarios para alcanzar eficacia terapéutica en este tipo de patologías.

En este trabajo se analizó el potencial terapéutico de varias estrategias diferentes de terapia génica: por un lado, empleando adenovirus (Ad) replicación-defectivos o plásmidos carentes de secuencias inmunoestimuladoras citosina-poli-guanina (*CpG-free*), ambos codificantes del gen de la citocina inmunomoduladora IL-10 y administrados por vía intravenosa (administración hidrodinámica para el plásmido) (*capítulo 1*); por otro lado, se emplearon moléculas pequeñas de RNA de interferencia (siRNA's), modificadas químicamente o no, con capacidad silenciadora de la citocina proinflamatoria TNF α y administradas por vía intrarectal (*capítulo 4*). Ambas intervenciones fueron diseñadas para tratar de forma independiente la colitis por sodio dextrano sulfato (DSS) en ratones de la cepa C57BL/6. Además, se estudió la respuesta inmune celular y humoral generada en ratones tras la reexposición a diferentes Ad portadores de transgenes inmunomoduladores (IL-10) o no inmunomoduladores (*green fluorescent protein*) (*capítulo 2*). Asimismo, con el objetivo de encontrar un vector con distribución específica hacia el colon que pudiera ser utilizado para alterar de forma selectiva la expresión génica en éste órgano, analizamos la biodistribución y bioseguridad de diversos adenovirus quiméricos obtenidos de la combinación de elementos del Ad5 -con tropismo hepático- y del Ad40 -con tropismo entérico- (*capítulo 3*).

Estos estudios nos han permitido contrastar la eficacia terapéutica de la sobreexpresión sistémica de IL-10 mediante dos vectores de terapia génica totalmente distintos en el modelo murino de colitis, y de poner de manifiesto el potencial de las estrategias basadas en la silenciación de TNF α a nivel local como alternativa al bloqueo sistémico de dicha citocina mediante la administración de anticuerpos o receptores solubles.

El plásmido *CpG-free* codificante de la IL-10 fue capaz de producir un importante beneficio terapéutico a corto y medio plazo, sin generar efectos tóxicos, mientras que la toxicidad tardía del Ad5IL-10 administrado por vía sistémica causó a medio plazo un aumento significativo de la mortalidad siendo, por tanto, un gran hándicap para su uso en clínica.

Por su parte, el siRNA TNF78 (siTNF78) con la doble modificación O-Metil y propandiol fue capaz de generar una mejora fenotípica en los ratones colíticos, mayor que la de los demás siRNA's ensayados, en consonancia con su mayor efecto silenciador *in vitro* e *in vivo* y con la ausencia de efectos inespecíficos (*off-target*).

Paralelamente, nuestro grupo consolidado junto con otros grupos integrantes de IBDnet ha conseguido generar un vector quimérico con tropismo selectivo hacia el colon mediante el reemplazo de proteínas *fiber* de la cápside del Ad5 por la *fiber* corta del Ad40.

Tras caracterizar la potente respuesta inmune generada *in vivo* por la administración reiterada del Ad5 clásico y evidenciar el efecto inmunomodulador atribuible al transgén de la IL-10 sobre dichas respuestas, proponemos que el uso de IL-10 como transgén en un vector de distribución local como el Ad5/40S podría ser una alternativa valiosa para el tratamiento de enfermedades intestinales crónicas como la IBD.



Introducción

Enfermedad Inflamatoria Intestinal
Modelos experimentales de IBD en roedores
Terapia Génica

1. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

1.1 Aspectos generales

La enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) hace referencia a un grupo de patologías de etiología compleja, multifactorial y desconocida que cursan con inflamación crónica y recurrente del tracto gastrointestinal. Los cuadros clínicos más representativos son la Enfermedad de Crohn (CD) y la Colitis Ulcerosa (UC). Si bien son entidades relativamente poco frecuentes, contribuyen de forma importante a la patología colorectal por su cronicidad, severidad, evolución con recaídas, complicaciones y alta morbilidad quirúrgica. La limitada eficacia de las terapias disponibles ocasiona deterioro de la calidad de vida del paciente y aumenta el riesgo de padecer cáncer colorectal [1]. Por ello, son las patologías crónicas más importantes que afectan al tracto gastrointestinal en humanos. En las últimas décadas ha tenido lugar un notable incremento de la incidencia de IBD a nivel mundial; este aumento se ha observado también en España, alcanzándose incidencias similares a las encontradas en Europa Central. Todo esto ha motivado el creciente interés por su estudio general, con el fin de mejorar su diagnóstico, terapia y manejo clínico diario [2].

En general, se afirma que la inflamación intestinal crónica humana surge de la interacción entre factores genéticos, ambientales e inmunológicos, y está asociada a pérdida de tolerancia hacia la microbiota. Ello ocasiona activación de linfocitos T, infiltración leucocitaria, producción de quimiocinas, citocinas proinflamatorias (TNF α , IL-1 β , IL-6, etc.), eicosanoides, enzimas proteolíticas y radicales libres por parte de células del sistema inmune (linfocitos, macrófagos, neutrófilos) y células epiteliales intestinales (IEC's). Los mediadores quimiotácticos atraen a más células inmunocompetentes dando lugar a una amplificación de la respuesta inflamatoria, que alterna periodos de actividad, inactividad y gravedad variable de la enfermedad, produciendo así recurrencias o nuevos brotes de la misma [3].

En resumen, se supone que la presencia de un factor iniciador (e.g., antígeno microbiano) provocaría en el intestino una respuesta inflamatoria prolongada, grave e inapropiada, en individuos predispuestos genéticamente [4, 5].

Alrededor de un 30% de los pacientes de IBD presentan además manifestaciones extraintestinales, más frecuentes en CD que en UC. Dentro de este amplio grupo se encuentran las alteraciones cutáneas (eritema nodoso, pioderma gangrenoso), osteoarticulares (artritis periféricas o centrales, osteopatías hipertróficas), oculares (uveítis, conjuntivitis), hematológicas o vasculares (trombosis venosa, anemia hemolítica, etc.), hepatobiliares y pancreáticas (esteatosis, hepatitis y pancreatitis crónicas), además de manifestaciones pulmonares, cardíacas, neurológicas y tiroideas [6].

Niveles elevados de algunos mediadores, como por ejemplo IL-1, IL-6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interferón γ (IFN- γ , -IFN de tipo II-) e IL-12, se correlacionan con la presencia de las alteraciones locales y sistémicas observadas en la IBD (fiebre, diarrea, dolor abdominal, formación de granulomas y estenosis, entre otros) [7].

1.2 Enfermedad de Crohn versus Colitis Ulcerosa

Las diferencias más importantes entre la CD y la UC son la distribución de las lesiones y la presencia o ausencia de inflamación en todo el espesor de la pared intestinal (*ver tabla 1*).

La **enfermedad de Crohn** ocasiona una inflamación transmural, que puede afectar a cualquier segmento del tracto gastrointestinal, si bien es más frecuente en la región ileocecal y en colon proximal. Es una patología segmentaria y multifocal en la que se intercalan áreas afectadas con áreas preservadas. La diarrea y el dolor abdominal son los síntomas más frecuentes. La enfermedad se caracteriza por los hallazgos macroscópicos (erosiones y/o perforaciones que le confieren el aspecto característico de *'empedrado'*, estenosis u obstrucción completa, abscesos, *etc.*) y microscópicos [8]. Pese a no haber hallazgos patognomónicos, la presencia de granulomas, -constituidos esencialmente por monocitos/macrófagos y, en menor medida, linfocitos, polimorfonucleares y fibroblastos-, es una característica diferencial de la CD [9].

ENFERMEDAD DE CROHN	COLITIS ULCEROSA
Desde la boca hasta el ano	Recto y/o colon
Afectación segmentaria y asimétrica	Afectación continua y simétrica
Transmural	Implica sólo la mucosa
Diarrea pastosa	Diarrea líquida con sangre, moco y pus
Fístulas y estenosis intestinal frecuentes	Fístulas y estenosis intestinal poco frecuentes
"Envoltura grasa"	Engrosamiento de capa muscular
Abscesos intraabdominales	Pocos abscesos
Enfermedad perianal	Rara enfermedad perianal
Úlceras serpinginosas, empedrado	Pérdida de patrón vascular, edema y úlceras
Histología característica: - granulomas - lesiones discontinuas - agregados linfoides - fibrosis	Histología característica: - absceso de cripta - lesiones continuas - depleción de mucina - distorsión de la arquitectura glandular

TABLA 1 : **Características diferenciales entre Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa.**

A diferencia de lo que ocurre en la CD, la **colitis ulcerosa** se limita a la mucosa del colon, fundamentalmente a la región distal (recto/ano), y se extiende en dirección proximal de forma continua. Se suele manifestar de manera gradual, aunque a veces también lo puede hacer bruscamente o como enfermedad fulminante, requiriendo tratamiento quirúrgico precoz [10]. El desarrollo de carcinoma colorectal es una posible complicación. Su cuadro clínico es variable y depende de la extensión y del grado de actividad inflamatoria. Los síntomas varían desde diarrea, presencia de sangre y/o moco en heces, incontinencia y tenesmo rectal, dolor abdominal, fiebre y pérdida de peso. A nivel macroscópico se evidencia un engrosamiento de la pared cólica y, en fases más avanzadas, un acortamiento del colon. La mucosa se halla congestiva y puede presentar ulceraciones e incluso pseudopólipos inflamatorios. A nivel microscópico, la inflamación afecta predominantemente a las capas más internas de la pared intestinal (mucosa y submucosa), y se caracteriza por necrosis epitelial, presencia de edema y hemorragia con infiltración de polimorfonucleares y células plasmáticas. Es frecuente la formación de abscesos de criptas (neutrófilos agregados) [11].

1.3 Epidemiología

Los estudios epidemiológicos de IBD no se limitan al mero análisis de la incidencia y prevalencia de estas enfermedades, sino que van orientados a determinar los factores de riesgo y contribuyen en el esclarecimiento de la etiología y la patogenia. Las tasas de incidencia de IBD han sufrido un notable aumento en todos los países desarrollados, llegando a estabilizarse desde los años 80 en unos 5-18 casos/100.000 habitantes/año para la UC, y 3,9-7 casos/100.000 habitantes/año para la CD en países occidentales [12]. La incidencia de dicha enfermedad varía en función del área geográfica, lo cual sugiere la influencia de factores ambientales y genéticos en su etiopatogenia. Tradicionalmente se estableció un gradiente 'Norte-Sur', pero actualmente es más acertado hablar de un gradiente 'Este-Oeste', relacionado con el mayor desarrollo tecnológico. Estas diferencias cada vez son menores y se prevé que en un futuro próximo las tasas de incidencia sean similares en todos los países. El último estudio realizado en el norte de España situaba la incidencia de UC en 5,2 casos/100.000 habitantes/año, y en 6,6 casos/100.000 habitantes/año para la CD [13]. Se calcula que hay unos 2,2 millones de afectados en Europa y 1,5 en EEUU y Canadá [14].

La frecuencia de aparición de la enfermedad se ve influida por una serie de factores demográficos como son la **edad**, el **género** o las **diferencias étnicas**. La edad de aparición del primer brote suele ser entre los 15 y los 40 años, con un segundo pico entre los 55 y los 65 años de edad [12]. En zonas de alta incidencia, la UC es más frecuente en hombres (12,6 pacientes masculinos/100.000 habitantes/año *versus* 11,2 pacientes femeninas/100.000 habitantes/año) y CD, en mujeres (7,9 pacientes femeninas/100.000 habitantes/año *versus* 6,2 pacientes masculinos/100.000 habitantes/año) [12], sucediendo a la inversa en los países de baja incidencia y menos desarrollados. En España no se encuentra gran variación en la incidencia entre sexos [2], aunque ambas entidades patológicas generalmente resultan más frecuentes en hombres [12]. Se han descrito dos etnias con comportamiento opuesto: la etnia negra, con una incidencia de enfermedad mínima, y la etnia judía, con elevada incidencia, siendo la frecuencia de aparición en este último grupo de 2 a 4 veces más elevada que en otros [15].

La CD presenta una baja letalidad pero a una alta morbilidad, mientras que la UC ocasiona una mortalidad más elevada, si bien los avances terapéuticos han disminuido este riesgo en los últimos años [2].

1.4 Etiología y fisiopatología

Aunque se ha progresado mucho en el entendimiento de la patogenia de esta enfermedad, su causa primaria sigue siendo un enigma. Como se comentó anteriormente, la hipótesis genérica apunta a que la IBD es el resultado de la existencia de una inflamación crónica en el tracto gastrointestinal, a causa de la combinación de **factores inmunológicos, genéticos y ambientales**. Evidencias actuales sugieren que en su patogenia está implicada

una alteración en la regulación de la respuesta inmune, propiciada por determinadas características genéticas frente a diversos antígenos intraluminales, incluida la microbiota [16]. Los estudios genéticos han permitido contrastar la heterogeneidad de estas patologías y plantear nuevas vías de abordaje terapéutico.

1.5 Factores predisponentes

Existe una serie de factores relacionados íntimamente con la aparición de la enfermedad, que pueden subdividirse en **intrínsecos** (propios del individuo), como alteraciones genéticas -que condicionan una alta predisposición hereditaria tanto en humanos como en animales de laboratorio- y en factores **extrínsecos**, que se detallan más adelante (ver apartado 1.5.3).

1.5.1 Factores genéticos

Son muchas las evidencias de la contribución de los genes en el desarrollo de IBD [17]. La evidencia más sólida procede de la observación de una alta concordancia en la frecuencia de aparición de la enfermedad en gemelos monocigóticos (44% de concordancia frente a un 7% de concordancia en dicigóticos) [18], más frecuente en CD que en UC [18-20]. El factor de riesgo más importante para padecer IBD es tener un familiar con la enfermedad, sobre todo en parientes de primer grado y aún más cuando los dos progenitores son afectados (riesgo >30%) [21].

En la actualidad, se han identificado 99 *loci*/genes relacionados con la predisposición genética a padecer IBD [22]. Entre ellos, los 9 más conocidos residen en los cromosomas 1, 3, 5, 6, 12, 14, 16 y 19 (denominados IBD7, IBD9, IBD5, IBD3, IBD2, IBD4, IBD1 e IBD8, respectivamente) [19, 23-27]. Visitar <http://www.ibdgenetics.org/> para más información.

Estudios de clonado posicional en el cromosoma 16 permitieron identificar el gen **NOD2/CARD15** (*nucleotide oligomerisation domain 2*, dominio de oligomerización de nucleótidos/*caspase activation and recruitment domain 15*, dominio de activación y reclutamiento de caspasas 15) como el gen IBD1. Éste codifica una proteína que se expresa en el citoplasma de monocitos/macrófagos, células dendríticas (DC's), enterocitos y células de Paneth, y actúa como receptor intracelular de reconocimiento de patógenos (PRR, *pattern recognition receptor*) e induce la apoptosis y/o la activación de NFκB (factor nuclear κB) en macrófagos estimulados por componentes bacterianos [28]. Las mutaciones en este gen están implicadas en la susceptibilidad a padecer CD [5, 29], apareciendo en un 50% de pacientes [5], si bien sólo un 20% de ellos sintetizan una proteína NOD2 truncada (por la mutación Leu1007). Esta mutación modifica la función de la proteína, imposibilitando el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's, *pathogen-associated molecular patterns*) y el control del estímulo antigénico. Diferentes estudios, *in vitro* y en ratones, demuestran que la ausencia de este gen o las mutaciones en el mismo puede desencadenar señalización TLR (*toll-like receptor*) defectuosa, así como un aumento en la producción de

citocinas proinflamatorias en monocitos y macrófagos por activación de NFκB (*gain of function mutation*), o bien una reducción de la capacidad para activar NFκB y una disminución de la síntesis de péptidos antimicrobianos en IEC's (*loss of function mutation*) [19, 20, 30]. En cualquier caso, la asociación entre mutaciones de NOD2 e incidencia de CD muestra la existencia de un vínculo entre la respuesta inmune frente a la microbiota y el desarrollo de la enfermedad [4, 5, 31-33].

Recientemente se han identificado nuevos genes asociados con esta patología. En 2004 se identificó el segundo gen asociado a la CD, el **DLG5** (*Drosophila discs large homologue 5*) [34], implicado en el mantenimiento de la integridad epitelial. Sin embargo, posteriormente *Friedrichs y col.* demostraron que esta variante de susceptibilidad para la CD era específica de varones [35]. También en 2004, *Peltekova et al.* descubrieron otro gen candidato, el **OCTN** (IBD5) (*organic cation transporter*, transportador de cationes orgánicos) [36]. Otra mutación asociada recientemente es la del gen del **receptor de IL-23**, que podría proteger frente a la CD [37]. La intensa actividad investigadora en este ámbito está dando lugar a la descripción de nuevos polimorfismos relacionados con la IBD, como los del **TLR9** [38], la molécula de adhesión **ICAM-1** con la CD [39], del **TLR4** con la CD y la UC [40], de la **IL-10** con la CD [41], etc.

La asociación genética más significativa y específica para la UC (así como para la CD colónica) se ha descrito con el alelo **DRB1*0103** (del HLA de clase II; gen IBD3) [42], aunque también resulta más específico de varones [19]. Al igual que en la artritis reumatoide, no está claro si las asociaciones con el HLA II y la IBD están relacionadas con el riesgo a padecer la enfermedad o con su severidad.

1.5.2 Factores inmunológicos

En humanos, la mucosa intestinal supone una extensión total de unos 300-400 m² y constituye el área más amplia y sensible de contacto y comunicación con el medio externo del individuo [43]. Dicha barrera se encuentra expuesta continuamente a una gran cantidad de antígenos microbianos y de la dieta, por lo que se acepta que el tracto gastrointestinal no sólo cumple las funciones de digestión y absorción de nutrientes, sino que interviene en la respuesta inmune innata del huésped frente a agentes extraños (*ver figura 1*).

Además de la protección física ejercida por el mucus y las uniones intercelulares estrechas, el sistema inmune ha de mantener un delicado equilibrio entre dos funciones opuestas: por un lado, responder eficazmente a la presencia de patógenos y por otro, tolerar la presencia de antígenos derivados de la dieta y la microbiota en simbiosis con el huésped [44-46]. Por ello, no es de extrañar que el tejido linfoide asociado al intestino (GALT) represente la mayor masa de tejido linfoide del organismo, con 10¹¹ células inmunitarias (*i.e.*, 80% del total en mamíferos) [47].

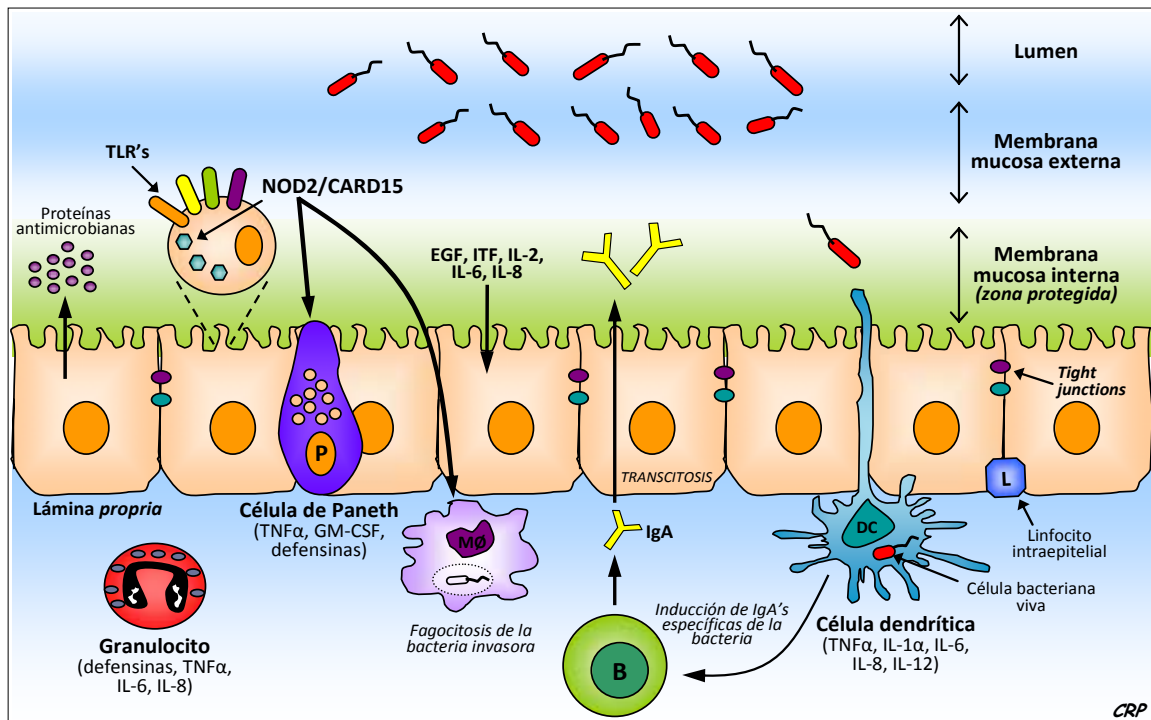


FIGURA 1: Barrera inmune innata intestinal y mecanismos que confinan a la microbiota en el lumen.

El sistema inmune innato es visto actualmente como el iniciador de la cascada de eventos que culminan en la IBD. Esto es debido, en parte, a la identificación de NOD2/CARD15 como un gen asociado a la EC. Dentro de los múltiples componentes de dicha barrera intestinal se incluyen las bacterias intestinales, el mucus, elementos circulantes (e.g., complemento, proteínas antimicrobianas, Ig's) y numerosos tipos celulares como las IEC's, neutrófilos, macrófagos y células de Paneth. Mientras que las bacterias están ampliamente distribuidas en la membrana mucosa externa, la interna es resistente a la penetración bacteriana. EGF, factor de crecimiento epidérmico. IEC, célula epitelial intestinal. ITF, intestinal trefoil factor. GM-CSF, factor estimulador de colonias granulocito-macrófago.

Adaptado de Korzenik JR y Podolsky DK, *Nature reviews*, 2006 y Hooper LV, *Nature reviews*, 2009.

En condiciones normales, existe una **inflamación controlada**, fisiológica, cuya desregulación puede conducir a una situación de **inflamación incontrolada**, patológica, en la que se pierde la tolerancia a antígenos de la microbiota [48, 49]. En esta situación se activan las respuestas del sistema inmune innato (IEC's, macrófagos, neutrófilos, etc.) y sucesivamente, la inmunidad adaptativa (linfocitos T y B). La interacción eficaz de ambos

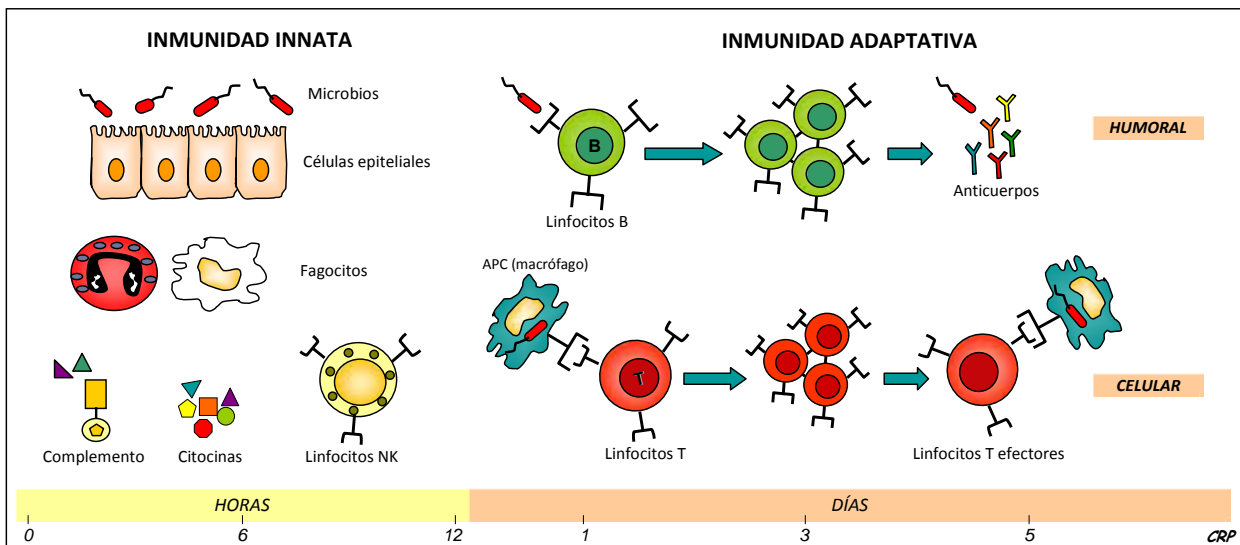


FIGURA 2: Inmunidad innata y adaptativa. Los mecanismos de la inmunidad innata constituyen la primera barrera defensiva contra la infección. Las respuestas inmunes adaptativas se desarrollan después y consisten en la activación de los linfocitos B y T.

La cinética representada de las respuestas innatas y adaptativas son aproximaciones y pueden variar según el tipo de infección.

Adaptado de Abbas AK, *Inmunología celular y molecular*, Saunders, 2005.

sistemas tratará de resolver la agresión (ver figura 2).

En la IBD, el fenómeno de tolerancia inmunológica se encuentra alterado al igual que la inmunidad innata y adaptativa. Se ha demostrado que los linfocitos de mucosa intestinal de pacientes con CD o UC activas proliferan cuando se exponen a su flora microbiana autóloga, hecho que no ocurre en individuos sanos [50]; esto sugiere que la pérdida de tolerancia a la microbiota puede ser un factor iniciador de IBD capaz de desencadenar, más adelante, una respuesta exagerada frente a la microbiota beneficiosa.

Diversos estudios han demostrado el papel proinflamatorio de citocinas y factores de crecimiento liberados por las IEC's en la respuesta inmune a nivel de la mucosa intestinal [51, 52]. Además, determinados modelos murinos de IBD han permitido detectar los genes potencialmente involucrados en la regulación de la respuesta inmune innata (TLR's, NOD, etc.), y estimar su contribución relativa a lo que designamos 'predisposición genética' a padecer dichas patologías [5, 53-55].

En los últimos años ha incrementado la importancia del papel que desempeñan los denominados 'factores microbiológicos' dentro de la etiopatogenia de la IBD (ver figura 3).

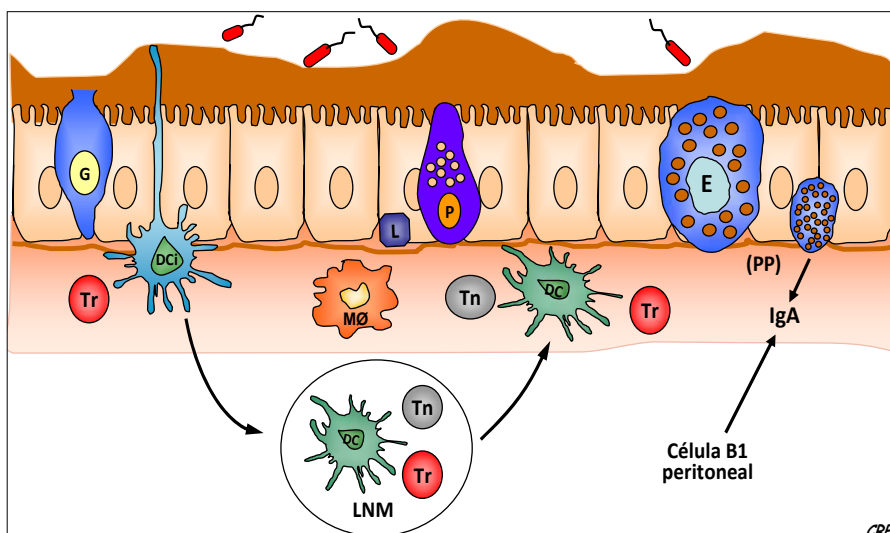


FIGURA 3a, Respuesta inmune mucosa frente a la microbiota en condiciones normales.

La respuesta inmune mucosa desencadenada frente a antígenos microbianos o de la dieta es multidimensional.

DC, célula dendrítica; DCi, DC inmadura; E, enterocito; IgA, inmunoglobulina A; G, célula goblet; L, linfocito; Tn, célula T naïve; Tr, célula T reguladora; LNM, linfonodo mesentérico; MØ, macrófago; P, célula Paneth; PP, placa de Peyer o folículo linfoide.

Adaptado de Xavier RJ y Podolsky DK, Nature Reviews, 2007.

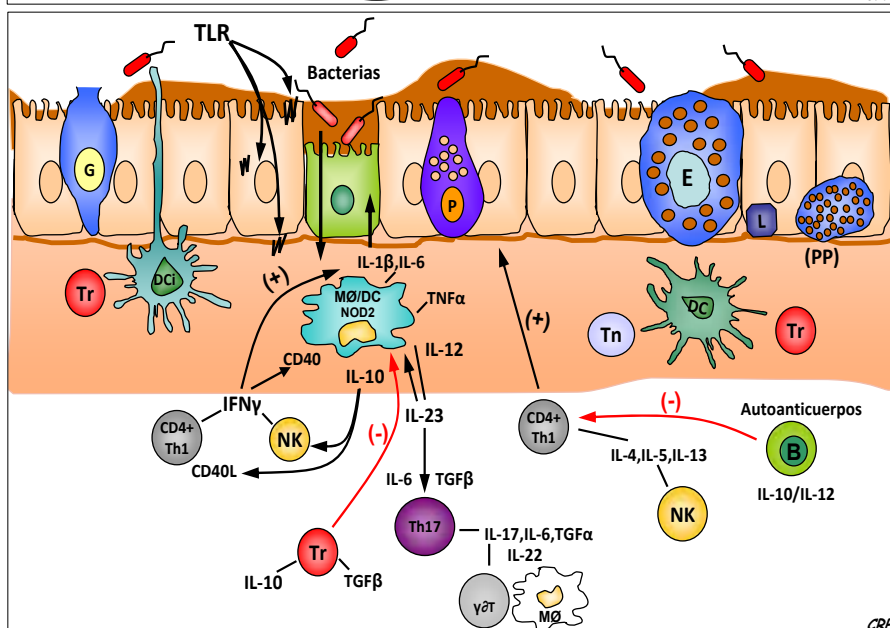


FIGURA 3b, Respuesta inmune mucosa en la IBD.

La respuesta inmune iniciada por los sistemas de detección microbiana desencadena respuestas inmunes adaptativas. Las bacterias comensales o patógenas alteran la función barrera en individuos susceptibles genéticamente, desencadenando el reclutamiento y la activación de respuestas inmunes innatas y adaptativas (e.g., linfocitos T CD4⁺). Múltiples componentes están implicados en el control de la respuesta inmune mucosa en los estados fisiológico y patológico de la inflamación.

NK, célula natural killer.

Adaptado de Xavier RJ y Podolsky DK, Nature Reviews, 2007.

Hoy en día, se considera que la microbiota intestinal es fundamental en el desarrollo de esta patología. Aproximadamente 10^{14} bacterias de unas mil especies distintas residen en el tracto gastrointestinal [56-60], y la competencia y sus interacciones ayudan a controlar la replicación de determinados gérmenes patógenos, así como a mantener la integridad de la barrera intestinal y su homeostasis inmunológica. Una característica fundamental de la microbiota comensal es su carácter no invasivo; es decir, su incapacidad para atravesar dicha barrera mucosa [12]. A pesar de ello, determinados tipos de predisposición genética podrían consistir precisamente en reaccionar de manera exagerada frente a estas bacterias comensales [61]. Así, está claramente establecido que en la IBD las áreas más frecuentemente afectadas son aquellas con mayor carga bacteriana (íleon, colon); los antibióticos de amplio espectro mejoran la inflamación intestinal [62] y la derivación quirúrgica del contenido intestinal previene la recurrencia de la CD [63]. Posiblemente la mejor evidencia es la que proviene de estudios en modelos animales [64]. Así, ratones deficientes en el gen de la IL-10 (KO IL-10) o ratas transgénicas para HLA-B27, que desarrollan colitis espontáneas en condiciones convencionales de estabulación, no lo hacen si se mantienen en un ambiente *germ-free* [65, 66].

Durante años se ha tratado de encontrar un agente infeccioso específico causante de IBD. Entre ellos se han incluido ciertas bacterias (*E. coli*, *Yersinia enterocolítica*, *Clostridium*, *Campylobacter*, *Mycoplasma*, etc.), micobacterias (*M. paratuberculosis*, *M. avium*, *M. kansasii*) y virus (*herpesvirus*, *citomegalovirus*), pero sin resultados concluyentes [12].

En pacientes de IBD se ha observado la existencia de disbiosis (*i.e.*, poblaciones bacterianas no comunes adheridas a la mucosa intestinal o en su interior con mayor frecuencia de *Bacteroides spp.*, *Enterobacterium spp.* en vez de *Lactobacilos* y *bifidobacterias*), que, junto con el sobrecrecimiento bacteriano, se asocia al desarrollo de la inflamación que caracteriza a esta patología [12]. La excesiva respuesta frente a antígenos ‘propios’ parece deberse a variantes y/o polimorfismos genéticos en los sistemas de reconocimiento de patógenos, TLR’s y proteínas NOD [5, 53].

1.5.2.1 INMUNIDAD INNATA: Receptores Toll-like e IBD

Diversos tipos de células del sistema inmune tienen la capacidad intrínseca de ‘monitorizar’ la presencia de microorganismos y de responder específicamente contra ellos mediante el reconocimiento de componentes altamente conservados, denominados genéricamente PAMP’s. El reconocimiento de dichos patrones corresponde a varias familias de receptores, denominados PRR’s, cuyos ligandos son moléculas como el lipopolisacárido, peptidoglicano, flagelina, DNA bacteriano, RNA vírico, etc. [67]. Dentro de los PRR’s, los denominados *toll-like receptors*, son un grupo de receptores particularmente relevantes en la activación del sistema inmune innato y adaptativo [68, 69]. Actualmente hay 13 tipos de TLR’s descritos en mamíferos (10 en humanos y 12 en ratones) [20, 70, 71] (ver tabla 2).

TLR	LIGANDOS	LOCALIZACIÓN	ESPECIE	Refs
TLR1	Peptidoglicano, Lipoproteínas	Superficie celular de macrófagos y neutrófilos (membrana plasmática).	Hu, mu	[72]
TLR2	Peptidoglicano de Gram+, lipoproteínas, zymosan...	Parte apical y/o basolateral de células epiteliales del colon (membrana plasmática), monocitos, macrófagos, DC's.	Hu, mu	[73]
TLR3	dsRNA viral	Reticulo endoplásmico, endosomas y lisosomas de DC's y linfocitos B. Superficie celular del endotelio, epitelio, fibroblastos.	Hu, mu	[72]
TLR4	LPS de Gram -	Parte apical y/o basolateral de células epiteliales del colon y aparato de Golgi en ID (membrana plasmática). Monocitos, macrófagos, DC's.	Hu, mu	[74]
TLR5	Flagelina	Parte basolateral de células epiteliales intestinales (membrana plasmática), monocitos, macrófagos, DC's.	Hu, mu	[72, 75]
TLR6	LPS	Bazo, timo, ovario, pulmón (membrana plasmática), monocitos, macrófagos, linfocitos B.	Hu, mu	[76]
TLR7	ssRNA viral	Endosomas y retículo endoplásmico de linfocitos B, pDC's.	Hu, mu	[77]
TLR8	ssRNA viral	Endosomas de monocitos, macrófagos y mDC's.	Hu, mu	[77]
TLR9	CpG DNA no metilado bacteriano	Membrana de células Paneth, células epiteliales, IEC's, monocitos, macrófagos, linfocitos B, DC's; endosomas y retículo endoplásmico en células inmunes inactivas.	Hu, mu	[77]
TLR10	?	Bazo, linfonodos, timo, tonsilas. En monocitos, macrófagos, células B.	Hu	[78]
TLR11	Bacterias uropatógenicas	Macrófagos, DC's, y células epiteliales de hígado, riñón y vejiga.	Mu	[79]
TLR12	Bacterias uropatógenicas	Macrófagos, y células epiteliales de riñón y vejiga.	Mu	?
TLR13	Virus	Bazo, DC's.	Mu	[80, 81]

TABLA 2: *Toll-like receptors*. hu, humano; mu, murino; ID, intestino delgado.; pDC, DC plasmacitoides; mDC, DC mieloides.

Los TLR's desempeñan un papel importante en el manteniendo de la homeostasis epitelial en el intestino. Se ha demostrado que ratones deficientes en la señalización de TLR's son más susceptibles a desarrollar la colitis inducida por DSS que los ratones *wild-type* [82].

En presencia de un determinado PAMP, los TLR's desencadenan respuestas como la expresión de péptidos antimicrobianos, la fortificación de la barrera intestinal y la proliferación epitelial [48], así como la activación de NFκB, con la subsiguiente inducción de genes proinflamatorios en respuesta a dichos componentes bacterianos. Los TLR's se expresan en enterocitos, macrófagos y DC's, y su expresión varía durante la inflamación [20].

Mientras muchos TLR's se localizan en la superficie celular, TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 circulan entre el retículo endoplásmico y diversos componentes intracelulares como los endosomas y lisosomas [83]. Esta continua circulación les sirve para 'escanear' la posible presencia de ácidos nucleicos microbianos (bacterianos, víricos o parasitarios). **TLR3** se expresa también en la superficie celular y reconoce RNA vírico de doble cadena (dsRNA) liberado durante la lisis celular. **TLR7 y TLR8** reconocen RNA viral de cadena sencilla (ssRNA). **TLR9** reconoce motivos no metilados CpG (Citosina-poli-Guanina), frecuentemente hallados en el DNA bacteriano [84]. La presencia de estos dinucleótidos CpG está suprimida en el genoma de vertebrados y cuando aparece, la citosina generalmente se haya metilada. De todas maneras, las diferencias estructurales entre el DNA procariota y eucariota no son la únicas que ejercen un papel importante en la diferenciación de lo 'propio' versus 'no propio'; el hecho de contener el DNA propio en el interior del núcleo celular y el TLR9 en compartimentos intracelulares (endosomas) ejerce un papel adicional a estos mecanismos de seguridad. Asimismo, el secuestro de los TLR7 y TLR8 en endosomas impide su contacto con los RNA's citoplasmáticos y sólo permite su acceso a RNA's víricos [85].

Se han descrito diferentes alteraciones en la expresión de los TLR's y su implicación en patologías inflamatorias como la IBD. Se ha observado una expresión reducida de TLR3 en las

IEC's en la CD pero no en la UC [86]. La presencia de mutaciones en el dominio extracelular del TLR4 se ha asociado con la hiporeactividad frente al LPS y la protección frente a la aterosclerosis [87]. Asimismo, se han descrito múltiples polimorfismos genéticos de varios TLR's asociados con la IBD, incluyendo el TLR1, TLR2, TLR3, TLR4 y TLR6 [40, 53, 86, 88-90], si bien se requieren más estudios funcionales para establecer la trascendencia real de estas alteraciones en la patogenia de la IBD [91].

En resumen, el déficit en las vías de señalización intracelular frente a los componentes bacterianos deteriora la respuesta inmune innata, esencial para contrarrestar la invasión bacteriana inicial, y puede condicionar a los pacientes a presentar una inflamación crónica y destrucción de la mucosa [43].

1.5.2.2 INMUNIDAD ADAPTATIVA: células T y células B

La mucosa gastrointestinal tiene una alta proporción de tejido linfoide que se localiza en tres compartimentos bien diferenciados: epitelio superficial, *lamina propria* de la mucosa y estructuras organizadas (placas de Peyer y folículos linfoides). La inducción de las respuestas inmunes adaptativas tiene lugar en estas estructuras foliculares organizadas.

Tras el insulto inicial, las células presentadoras de antígeno (APC's) en la mucosa procesan dicho antígeno, lo que da lugar a la migración de las APC's a los nódulos linfáticos mesentéricos para presentarlo a los linfocitos T *naïve*; estos se desplazarán, tras su activación, a la mucosa dañada para iniciar los procesos de la inmunidad adaptativa. En los mecanismos de extravasación y migración desde la circulación periférica hasta las placas de Peyer o los nódulos linfáticos mesentéricos intervienen moléculas de adhesión como MadCAM-1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule 1*), GlyCAM-1 (*Glycosylation dependent cell adhesion molecule 1*), integrinas ($\alpha_4\beta_x$), etc. [92].

El primer encuentro con el antígeno es el que determinará el fenotipo de la célula T que dependerá, no sólo de la naturaleza del antígeno, sino también de las señales coestimuladoras que intervengan en su presentación. En términos generales, esta diferenciación puede ser hacia linfocitos T colaboradores (T *helper*, T_H) CD4⁺ o linfocitos T citotóxicos CD8⁺ efectoras o de memoria. Tras su expansión clonal, las células T CD4⁺ adquieren un fenotipo T_{H1}, T_{H2} o T_{H17}, que se distinguen por las citocinas que producen en respuesta a su activación [92] (*ver figura 4*). Las células T_{H1} producen grandes cantidades de IL-2, IFN- γ y TNF α ; las células T_{H2} producen de forma característica IL-4, IL-5 e IL-13, además de IL-10 [93], mientras que las células T_{H17} dan lugar a secreción de IL-17, IL-6 y TNF α [94, 95]. Asimismo, el tipo de citocinas presentes en el entorno en el que se encuentran las células T *naïve* participa también en la determinación del fenotipo: la IL-12 junto con el IFN- γ y la IL-18, producidas por las APC's, inducen diferenciación hacia T_{H1}; la IL-4, producida por células *natural killer* (NK), mastocitos, basófilos y células T CD4⁺ maduras, conduce hacia la diferenciación a células T_{H2}; la IL-23, producida por macrófagos y DC's, induce diferenciación a T_{H17} [95]. Las células T_{H1} y T_{H2} regulan su actividad mutuamente mediante mecanismos de retroalimentación (*feed-back*) a través de las citocinas que liberan, de forma que la

diferenciación a T_H2 se encuentra inhibida por el $IFN-\gamma$, mientras que la diferenciación a T_H1 está bloqueada por la $IL-10$ [96].

En los últimos años, se ha descrito una nueva población de células $T CD4^+$, las T reguladoras (Tr), T_H3 y $Tr1$, que producen citocinas inmunomoduladoras. Las T_H3 producen principalmente $TGF-\beta$, mientras que las $Tr1$ secretan $IL-10$; ambas citocinas resultan clave en el control y la modulación de la inflamación y los fenómenos de inmunotolerancia, controlando a su vez la activación de otros tipos celulares [97, 98] y la secreción de mediadores proinflamatorios derivados de células T_H1 y/o macrófagos [99, 100]. Estudios recientes sugieren que el $TGF-\beta$ es también importante en el mantenimiento del equilibrio entre las respuestas proinflamatorias T_H17 y las reguladoras antiinflamatorias $Tr1$ [101].

Asimismo, las células T_H2 controlan la producción de los isotipos de inmunoglobulinas (Ig) IgG_1 , IgG_{2b} , IgA e IgE a través de la secreción de citocinas como la $IL-4$, mientras que las células T_H1 controlan los isotipos IgG_{2a} e IgG_3 a través de la producción de $IFN-\gamma$ [102].

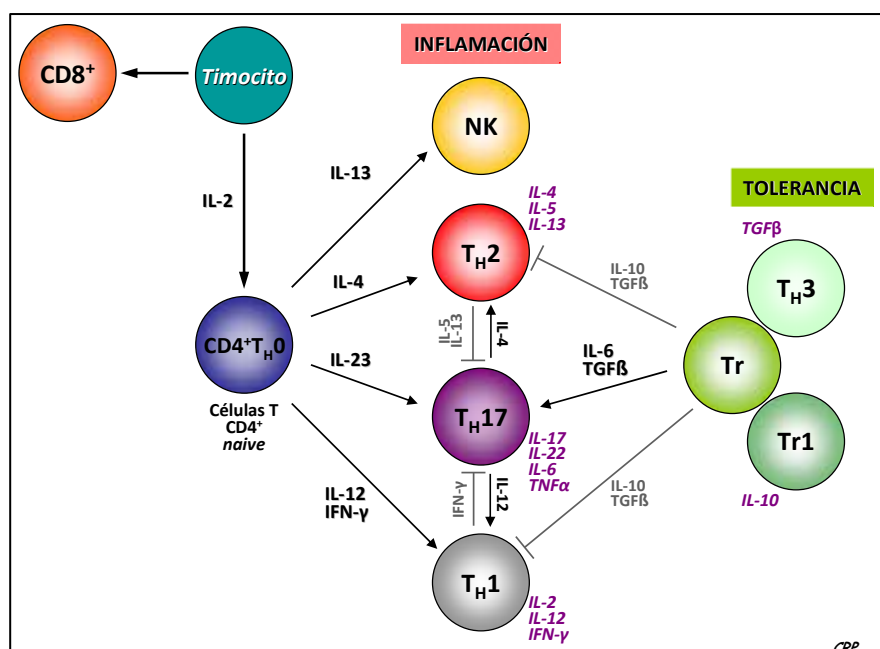


FIGURA 4: Diferenciación de células $T CD4^+$ y perfil citocínico.

El balance relativo entre las células T efectoras y las células T reguladoras determina el equilibrio entre tolerancia e inflamación. Las células T_H1 , T_H2 , T_H17 y Tr están presentes en la mucosa intestinal y su diferenciación viene determinada por las citocinas, quimiocinas y productos bacterianos presentes local- y sistémicamente; de esta forma se determina el tipo de respuesta inflamatoria en el huésped.

Adaptado de Korzenik JR y Podolsky DK. *Nature reviews*, 2006.

Por tanto, el tipo de estímulo de diferenciación determinará qué fenotipo adquirirán las células $T naïve$ y, a su vez, el tipo de respuesta. La inducción de una respuesta T_H2 desencadena principalmente fenómenos alérgicos [103]; las respuestas T_H1/T_H2 inducen generalmente fenómenos inflamatorios [104]; las respuestas T_H17 están implicadas en ambos procesos [105, 106]. La función de las células T reguladoras es tratar de contrarrestar todos estos fenómenos.

Estudios basados en modelos experimentales de inflamación intestinal indican que las células $T CD4^+$ juegan un papel importante en los eventos inmunoreguladores en la inflamación de la mucosa y que la presencia de la microbiota es un requisito esencial para que se produzca la inflamación intestinal incontrolada [31]. La activación de células $T CD4^+$ es antígeno-dependiente y los antígenos implicados posiblemente tengan su origen en la luz

intestinal, lo que apunta a que los factores intraluminales son responsables de la inducción/perpetuación de la respuesta inmune excesiva que produce el daño tisular en la IBD [49]. Sin embargo, hay que señalar que en la CD tiene lugar una reacción de hipersensibilidad mediada por células T, mientras que en la UC predomina el incremento de la inmunidad humoral. La presencia de flora bacteriana residente y linfocitos T CD4⁺ activados son requisitos indispensables para que se desarrolle la IBD. Además, se ha demostrado que la capacidad funcional de las células T de la mucosa es diferente en CD y UC; los linfocitos T de la mucosa de pacientes de CD proliferan considerablemente más que en pacientes con UC [107] y además son más resistentes a la apoptosis [107, 108]. Esta última característica ha resultado básica en la terapia de la CD, como se verá más adelante (*ver apartado 1.6*) [109].

Las **células B** también participan en la respuesta adaptativa de las mucosas. Los linfocitos B, tras reconocer el antígeno presentado por las DC's, migran a los nódulos linfáticos regionales (*e.g.*, mesentéricos), donde maduran a células plasmáticas; después migran como célula plasmática a la *lamina propria* de la mucosa intestinal donde se diferencian y secretan IgA [110, 111]. Estas IgA's protegen el epitelio intestinal de la posible translocación antigénica hacia la *lamina propria*.

En la IBD se observa una producción exagerada de anticuerpos tanto a nivel sistémico como en la mucosa, mayor en la UC, donde hay un incremento de Ig's, sobre todo de IgG₁ [112, 113]. Como consecuencia, en pacientes se encuentran niveles elevados de anticuerpos séricos contra diversos componentes intestinales (IEC's, linfocitos, proteínas del citoesqueleto, así como frente a antígenos bacterianos -ASCA (anticuerpo anti-*Saccharomyces cerevisiae*)- y de la dieta). Algunos de estos anticuerpos se dirigen frente a moléculas del huésped, como los ECAC (componentes asociados a las células epiteliales), el hTM5 (fracción 5 de la tropomiosina humana) y p-ANCA (anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos con patrón perinuclear) [114-116]. En CD y UC se dan perfiles diferentes de estos marcadores serológicos que, en algunos casos, permiten predecir el curso clínico de la enfermedad, pueden facilitar su diferenciación clínica y pueden llegar a ser un indicio de gran utilidad para desvelar su posible etiología [117, 118].

1.5.2.3 Patrón de citocinas en IBD

En la IBD existe un patrón de citocinas T_H1/T_H17/T_H2 diferente, responsable en gran parte de la respuesta exagerada e incontrolada que se genera (*ver tabla 3*). En ambos cuadros clínicos se produce una síntesis elevada de citocinas y quimiocinas proinflamatorias -**IL-1β, IL-6, TNFα, IL-8**- [119-121]. Parece ser que el factor de transcripción NFκB es el que regula la expresión de dichas citocinas en linfocitos, monocitos e IEC's, y que su actividad se encuentra aumentada en la mucosa de pacientes con enfermedad activa [122].

La **CD** se ha considerado generalmente un proceso inflamatorio con predominio de citocinas de tipo T_H1, caracterizado por la producción de **IL-2, IFN-γ, IL-12, TNFα e IL-18** [123-127]. La participación de TNFα, IFN-γ e IL-12 en la CD resulta evidente en estudios en los que

la administración de anticuerpos frente a estas citocinas suprime el desarrollo de la enfermedad [128-131]. Recientemente, se ha demostrado la gran implicación de las células T_H17 y el eje IL-23/IL-17 en este cuadro clínico [20, 95, 132, 133].

RESPUESTA INMUNE INNATA			RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA		
CITOCINA	CD	UC	CITOCINA	CD	UC
IL-1 β	↑	↑	IL-5	N	↑
IL-6	↑	↑	IL-13	N	↑
IL-8	↑	↑	IL-17	↑	N
IL-12	↑	N	IL-21	↑	N
IL-18	↑	↑	IFN- γ	↑	N
IL-23	↑	N	IL-22	↑	↑
IL-27	↑	N			
TNF α	↑	↑			
IL-32	↑	↑			

TABLA 3: Patrón de citocinas en IBD. N, normal.
Adaptado de Shih and Targan, World J. Gastroenterol, 2008.

En la UC, por el contrario, predomina una respuesta T_H2 atípica (con aumento de IL-5 e IL-13, pero no de IL-4, y niveles altos de IFN- γ) [2, 7, 134] y dependiente de anticuerpos. Además, datos recientes confirman la eficacia de agentes anti-TNF α para el tratamiento de la UC, reforzando aún más el concepto de enfermedad T_H2 atípica [135]. Asimismo, en la UC existe un incremento de linfocitos NK, produciéndose más IL-13 e IL-5, lo que tiende a amplificar la respuesta y a perpetuar la inflamación [20, 136].

Otras citocinas que se encuentran aumentadas en pacientes de IBD son la IL-17 (más en CD que en UC) [137], la IL-23 [132] y el TGF- β [138]. Los niveles séricos de IL-10 también se ven ligeramente incrementados en ambos cuadros clínicos en fase activa [139], si bien a nivel de mucosa intestinal sólo se detectan niveles elevados de IL-10 en pacientes con UC activa [140], aunque con resultados controvertidos [141].

1.5.3 Factores ambientales

Son muchos los factores ambientales implicados en la patogenia de la IBD; algunos se comportan de forma totalmente diferente en la UC y en la CD, confirmando una vez más su heterogeneidad. Dentro de los factores extrínsecos de riesgo se aceptan la asociación con diferentes enfermedades autoinmunes (espondilitis anquilopoyética HLA-B27+, esclerosis múltiple, psoriasis, etc.), el hábito tabáquico, la dieta, las infecciones perinatales, el uso de anticonceptivos orales, el nivel de higiene y los factores psicosociales.

El tabaco es el factor extrínseco descrito de mayor potencia y presenta un llamativo efecto opuesto en ambas entidades patológicas: resulta un importante factor de riesgo para la CD, directamente implicado en su aparición y agravamiento [142], pero se muestra como un factor protector en la UC [143, 144]. Sin embargo, el hecho de ser ex-fumador se comporta como factor de riesgo para la UC, incluso mayor que en personas que nunca han fumado

[144, 145]. En diferentes estudios se observa que la administración de nicotina mejora la colitis, coincidiendo con una disminución local de citocinas pro-inflamatorias [146, 147].

La **dieta** ejerce un papel importante en la IBD, como cabe esperar de una patología que afecta al tracto gastrointestinal. Se ha observado que el consumo de azúcares refinados puede ser un factor de riesgo para la CD, aunque no tanto para la UC; en cambio, la ingestión de grasas (mayoritariamente saturadas) y el bajo consumo de vegetales, fruta y fibra han sido asociados con una mayor predisposición a padecer ambas manifestaciones clínicas [148].

El adecuado grado de **higiene**, también relacionado con un nivel socioeconómico elevado, ha sido implicado en una mayor predisposición a padecer CD [149].

Los anticonceptivos orales [150] y los antiinflamatorios no esteroideos [151] son los dos principales grupos de **fármacos** que han sido estudiados por su posible asociación con el desarrollo de la enfermedad, si bien los resultados no han sido concluyentes.

El **estrés** y los factores psicosociales están también asociados con la IBD, si bien como un factor modulador más que inductor. Existen estudios en los que un estrés duradero se relaciona con una exacerbación de los síntomas [152], al igual que sucede en animales de laboratorio como se verá más adelante (*ver apartado 2.1.1*) [153].

1.6 Tratamientos actuales de la IBD

Los objetivos principales de la terapia farmacológica son promover la remisión de los brotes y prevenir las recidivas, así como mejorar la calidad de vida de los pacientes y lograr la curación de la mucosa, con el menor riesgo posible. Esto sólo se consigue actuando sobre la respuesta inmunológica exacerbada, atacando en varios frentes o bien sobre alguno de ellos que posea mayor relevancia [118]. Lamentablemente, aún no se dispone de un tratamiento curativo debido al limitado conocimiento de su etiología y a que su curso clínico es difícil de predecir.

Algunos de los tratamientos disponibles en la actualidad son los fármacos antiinflamatorios, los inmunosupresores y las terapias biológicas emergentes.

- Antiinflamatorios (aminosalicilatos y corticoides):

Los **aminosalicilatos** (*sulfasalazina, mesalazina, olsalazina, etc.*) son un grupo de fármacos que constituyen uno de los principales agentes en el tratamiento de la IBD [154]. Su actividad se debe a su efecto antiinflamatorio local sobre la mucosa intestinal, tanto cuando se administran por vía oral como por vía tópica intrarectal, limitando la producción de radicales libres y citocinas proinflamatorias como el TNF α [155]. Están indicados como terapia de mantenimiento, en casos de corticodependencia, en brotes leves de CD y UC [156] refractarios a esteroides y en la prevención de la reactivación de la UC [157], pero su efectividad es cuestionable en la CD [158].

Los **corticoides** (*prednisona, metilprednisolona, prednisolona, etc.*) constituyen el primer agente terapéutico, ya sea de forma oral o parenteral, en el tratamiento de los brotes

moderados y graves de CD y UC [159] y en los casos de falta de respuesta a los salicilatos [160]. El problema es la aparición de múltiples efectos adversos tras su uso crónico. Por ello se han desarrollado corticoides de administración oral o rectal de actuación local (*budesonida*) para tratar de minimizar estas reacciones secundarias. Sin embargo, cabe destacar, que en un 20-30% de casos o bien no hay respuesta (corticorretractariedad) o bien se reactiva la enfermedad tras suspender el tratamiento (corticodependencia) [161]. Los corticoides ejercen múltiples efectos en el sistema inmunitario y disminuyen la inflamación al reducir la vasodilatación, la permeabilidad vascular, la infiltración y proliferación leucocitaria, así como la producción de diversas citocinas proinflamatorias [162].

- **Inmunosupresores:** entre ellos, la *azatioprina*, la *6-mercaptopurina*, el *metotrexato* y la *ciclosporina A*. Todos ellos actúan inhibiendo la inflamación a diferentes niveles y están aprobados para su uso tanto en CD como en UC. El problema es que también desencadenan múltiples efectos secundarios (pancreatitis por *azatioprina*, toxicidad hepática por *metotrexato*, toxicidad renal y neurológica por *ciclosporina*) y comportan una mayor vulnerabilidad del paciente frente a infecciones oportunistas [161].

- **Terapias biológicas:** Este término engloba una serie de tratamientos basados en diferentes conceptos, desde la administración de probióticos, proteínas recombinantes (hormonas), hasta el uso de ácidos nucleicos (oligonucleótidos antisentido) o anticuerpos monoclonales. Dentro de esta última categoría existen diversas estrategias: por un lado, el bloqueo de citocinas proinflamatorias como $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, *etc.* y, por otro, la interferencia en el reclutamiento de células inflamatorias mediante anticuerpos frente a moléculas de adhesión [161].

Dado el importante papel que desempeña el **$\text{TNF}\alpha$** en la patogenia de la IBD, se han generado diversos anticuerpos monoclonales (*infliximab*, *adalimumab*, *certolizumab pegol*, *etc.*) que reducen selectivamente los efectos de esta citocina. El *infliximab* es un anticuerpo monoclonal quimérico murino/humano, que se une tanto a las formas solubles como transmembrana del $\text{TNF}\alpha$, inhibiendo su efecto proinflamatorio inmediato (*ver apartado 1.8*) [163]. Estos fármacos resultan relativamente eficaces tanto en la remisión de la enfermedad activa (sobre todo en la CD) como en su mantenimiento, al ser capaces de inducir apoptosis en monocitos y linfocitos activados [135, 164-166]. Sin embargo la principal limitación del *infliximab* es la generación de anticuerpos anti-quiméricos [167], además del desarrollo de infecciones e incluso tumores sólidos o linfomas a largo plazo; si bien, la mayoría de datos clínicos en cuanto al desarrollo de tumores provienen de estudios realizados en pacientes de artritis reumatoide [168] y hay poca evidencia clínica en pacientes de IBD. El *adalimumab*, un anticuerpo monoclonal humano, es actualmente el fármaco anti- $\text{TNF}\alpha$ más empleado para el tratamiento de la CD, al presentar importantes ventajas respecto al *infliximab* (administración subcutánea, menos efectos adversos). La relativa eficacia de los diferentes tratamientos anti- $\text{TNF}\alpha$ ha demostrado la implicación de esta citocina en la patogenia de la IBD, pese a que con el *infliximab* se ha señalado que su efecto beneficioso viene determinado en mayor medida

por la inducción de apoptosis de células T activadas de forma crónica en colon, más que por el bloqueo directo del TNF α [169, 170].

Existe una gran cantidad de terapias biológicas emergentes ya que el número de dianas terapéuticas potenciales es cada vez más amplio. Así bien, se han desarrollado anticuerpos frente citocinas proinflamatorias como el **IFN- γ** (*fontolizumab*, anticuerpo monoclonal humanizado) [130], **IL-12/IL-23 p40** (J695, anticuerpo monoclonal humano) [131] e **IL-18** [126, 171] y la mayoría de ellos han resultado efectivos en CD. Asimismo, existen anticuerpos **anti-CD3** (*visilizumab*) [172], **anti-CD4** (cM-T412) [173], frente al **receptor de la IL-2** (*daclizumab*) [174], frente al **receptor de la IL-6** (*tocilizumab*) [175], **inhibidores de moléculas de adhesión**, como el anticuerpo monoclonal de ratón humanizado anti-integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$ (*natalizumab*), eficaz en la remisión de la CD y la UC [170, 176, 177].

La administración de **citocinas antiinflamatorias recombinantes** humanas (IL-10, IL-11, IFN- α o IFN- β_{1a} -IFN's de tipo I-) ha sido también probada en pacientes de IBD con resultados controvertidos [178-180].

1.7 La citocina anti-inflamatoria IL-10

La interleucina 10 es una citocina pleiotrópica con funciones diversas en la inmunoregulación y la inflamación. Actúa suprimiendo la inflamación intestinal a diferentes niveles e inhibiendo las respuestas inmunes del huésped, sobre todo aquéllas en las que intervienen los macrófagos. Por un lado, inhibe la presentación de Ag (al disminuir la expresión de las moléculas de MHC II y coestimuladoras en macrófagos y DC's), la proliferación de células T CD4⁺ y su diferenciación a linfocitos T_H1 (al inhibir la liberación de IL-12), y suprime la producción de otras citocinas proinflamatorias como TNF α , IL-1, IL-6, IL-12, quimiocinas, moléculas de adhesión, así como moléculas coestimuladoras (B7-1, B7-2) en monocitos/macrófagos, DC's, neutrófilos y células T [181, 182]. Por otro lado, existen evidencias de que actúa promoviendo la diferenciación y la formación de clones antígeno-específicos de células T reguladoras [183, 184].

Otra función importante es el efecto que ejerce sobre el mantenimiento de la barrera de la mucosa intestinal y, en particular, en la regulación de las proteínas (occludina, E cadherina, etc.) de las uniones intercelulares estrechas (*tight junctions*) del epitelio del tracto digestivo [185]. La ausencia de dicha citocina, alteraría esta estructura intercelular y favorecería el paso de antígenos lumbinales a través de la mucosa, existiendo así, una mayor comunicación entre el medio interno y externo e incrementando el riesgo de desatar fenómenos inflamatorios o infecciosos (*ver figura 5*).

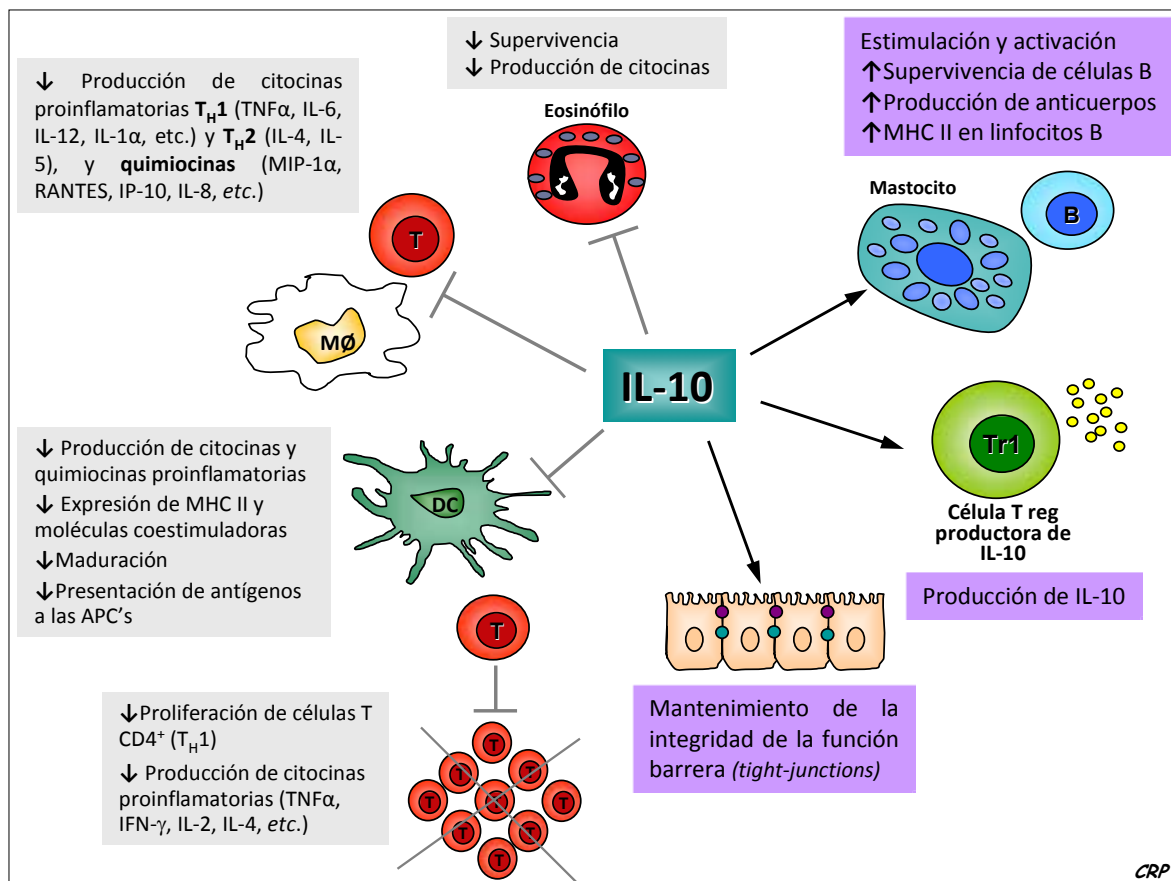


FIGURA 5: La IL-10 es una citocina pleotrópica que inhibe la activación y generación de otras citocinas en macrófagos y DC's así como la supervivencia de eosinófilos (importante en alergias). También inhibe la función de APC's incluyendo la maduración de las DC's, la expresión de moléculas MHC de clase II y moléculas coestimuladoras, y la activación de células T_H2 . También puede promover la inducción de células Tr productoras de IL-10. Todos estos tipos celulares producen IL-10 para limitar la respuesta inmune y prevenir el daño.

MIP-1 α , proteína inflamatoria de macrófagos 1 α ; **RANTES**, *Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted*; **IP-10**, proteína inducible 10.

Adaptado de Hawrylowicz y O'Garra, *Nature Reviews Immunology*, 2005.

En general, la IL-10 ejerce un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis y la tolerancia inmunológicas [186], así como en la regulación del balance T_H1/T_H2 , promoviendo el desarrollo de un patrón T_H2 predominante (con inhibición de IFN- γ , IL-12, etc.) y la proliferación de células B y su diferenciación a células plasmáticas productoras de Ig's [182]. Sobre las células T, por el contrario, parece ejercer un efecto inmunosupresor al inhibir tanto su proliferación como la síntesis de citocinas [182]. Por tanto, media acciones tanto inmunosupresoras como inmunoestimuladoras en función del tipo celular y el microambiente local.

Las células T_H2 fueron consideradas la fuente primaria de IL-10, a la vez que secretaban también IL-4, IL-5 e IL-13, implicadas en procesos alérgicos y respuestas frente a patógenos extracelulares [187]. Pero la producción de IL-10 no se limita a las células T_H2 , sino que las células T_H1 también la secretan, en respuesta a la invasión de patógenos intracelulares y a procesos inflamatorios desmesurados, controlando así la inflamación. Por tanto, la IL-10 es producida generalmente por células T_H2 , Tr1, células B, DC's, pero sobre todo por macrófagos activados [186, 188, 189].

Se ha detectado una homología de un 73% en las secuencias codificantes de la IL-10 humana, murina y viral (producto codificado del virus Epstein-Barr) [181]. Además, la IL-10 viral se une tanto a los receptores humanos como a los murinos, y comparte sus funciones inmunoregulatoras (supresión de células T_H1, inhibición de monocitos) pero carece del efecto inmunoestimulador. Por tanto, esta actividad inhibitoria exacerbada, hace que la IL-10 viral sea una candidata terapéutica óptima para la generación de tolerancia [190].

Existen estudios que sugieren que hay una mayor predisposición a padecer IBD (sobre todo UC) en individuos genéticamente propensos a producir cantidades bajas de IL-10 [191]. En general, se acepta que la baja producción de IL-10 y la pobre respuesta observada a la IL-10 recombinante humana (IL-10rhu) en células mononucleares de la *lamina propria* de mucosa colónica inflamada son compartimento-específicas, más que específicas de la enfermedad [141]. Sin embargo otros estudios sugieren más bien una falta de sensibilidad a la IL-10 que podría estar relacionada con alteraciones a nivel de su receptor [196].

Los animales KO IL-10 desarrollan una ileocolitis espontánea a partir de los 2-3 meses de edad muy similar a la CD. Las similitudes se dan no sólo en la clínica (anemia, leucocitosis, pérdida de peso corporal, aumento de proteínas de fase aguda, etc.), sino también en su histopatología (presencia de edema inflamatorio en mucosa y submucosa, abscesos de criptas, con lesiones multifocales alrededor del colon y el intestino delgado). A nivel inmunológico, la transferencia de células T CD4⁺ de *lamina propria* de animales KO IL-10 a la cepa de ratones RAG-2^{-/-} (carentes de linfocitos) desencadena la colitis, demostrando la implicación de las células T CD4⁺ que, como en la CD, muestran un fenotipo T_H1 (producen IFN- γ predominantemente) [54]. Cabe destacar que el desarrollo de la colitis en animales KO IL-10 es dependiente de la exposición a bacterias luminales, puesto que el mantenimiento de dichos animales en condiciones axénicas o *germ-free* evita el desarrollo de la enfermedad, que sin embargo se instaura al reconstituir la flora bacteriana [65]. Ello sugiere que la IL-10 es importante en el mantenimiento de la tolerancia hacia la flora comensal [183].

Existen diversos tratamientos empleando IL-10 exógena: IL-10 recombinante, bacterias modificadas genéticamente para producir IL-10, microesferas de gelatina conteniendo IL-10, vectores adenovirales para expresar IL-10, células T reguladoras combinadas, etc. [192].

Los estudios clínicos dirigidos a valorar los efectos de la administración IL-10rhu indican que la inyección parenteral diaria durante un mes sólo produce una leve mejoría de los índices de actividad de CD en pacientes con un índice moderado [179], con resultados más pobres cuando el índice de actividad es más elevado [178].

La baja biodisponibilidad (la semivida de la IL-10 sérica es de 20 minutos [193]), el coste, la limitada eficacia de la IL-10rhu, así como la indefensión del paciente frente al desarrollo de infecciones o incluso tumores debidos a dichos tratamientos, han desestimado su aplicación [182, 194]. Pese a todo, existe evidencia de que la administración de adenovirus portadores del gen de la IL-10 murina (*AdvmuIL-10*) a roedores previene el desarrollo de colitis y/o mejora la enfermedad preestablecida [195-197].

1.8 La citocina pro-inflamatoria TNF α

El factor de necrosis tumoral alfa juega un papel primordial en la patogenia de la IBD por su capacidad de aumentar su propia expresión y la de otras moléculas proinflamatorias, tanto en IEC's como en células inmunitarias [194, 198, 199]. Esta citocina pleiotrópica, descrita por primera vez en 1975 por Carswell y col. [200], es el principal mediador de la respuesta aguda hacia determinados microorganismos nocivos, aunque es también responsable de muchas de las complicaciones sistémicas de las infecciones graves [186, 201-203]. Se identificó originariamente como una sustancia presente en el suero de animales tratados con LPS, que causaba la necrosis de tumores *in vivo*; de ahí recibió su nombre [186].

Sus funciones biológicas están implicadas en los procesos inflamatorios e infecciosos tempranos; entre ellas destacan la proliferación, la diferenciación y la apoptosis celulares, la remodelación tisular (incrementa el número de metaloproteinasas de matriz, MMP's), la alteración de la permeabilidad de la barrera intestinal, el aumento de la permeabilidad vascular y la coagulación, la activación de macrófagos, el reclutamiento de células inflamatorias (por producción de IL-8 en el endotelio) y la inducción de la expresión de moléculas de adhesión [204-206]. Además, el TNF α está implicado en el correcto desarrollo y maduración de los órganos linfoides secundarios [202, 203]. Su principal función consiste en reclutar neutrófilos y monocitos hacia las zonas de infección y activar estas células como mecanismo defensivo, actuando sobre las células del endotelio vascular y los leucocitos (*ver figura 6*).

Aunque localmente los efectos del TNF- α pueden ser beneficiosos, en las infecciones graves la cantidad de citocina producida es tan grande que entra en el torrente circulatorio y actúa no sólo localmente sino de forma endocrina, y produce anomalías clínicas y anatomopatológicas sistémicas [186]. A nivel del hipotálamo actúa como pirógeno endógeno y estimula el eje hipotálamo-hipofiso-adrenal, produciendo la liberación de la hormona liberadora de corticotropina. La secreción prolongada de TNF α produce pérdida de células musculares y adiposas (*i.e.*, produce caquexia) [198, 201, 207]. En el *hígado*, genera una estimulación de la fase aguda de la inflamación, activando la síntesis de la proteína C reactiva, proteína amiloide A y otros mediadores de fase aguda [186]. En cantidades elevadas, su liberación produce activación local del *endotelio vascular*, producción de óxido nítrico con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, que conduce al reclutamiento de las células inflamatorias, inmunoglobulinas y complemento, provocando la activación de los linfocitos T y B. También induce la activación y agregación plaquetaria, produciendo trombosis intravascular. Probablemente, la oclusión vascular que se genera sea la causa de la necrosis tumoral asociada a esta citocina [198]. Concentraciones circulantes elevadas de esta citocina originan trastornos metabólicos graves, como hipoglucemia letal (por uso excesivo de la glucosa y la incapacidad hepática para producirla), así como síndromes como el shock séptico o la coagulación intravascular diseminada [186, 198].

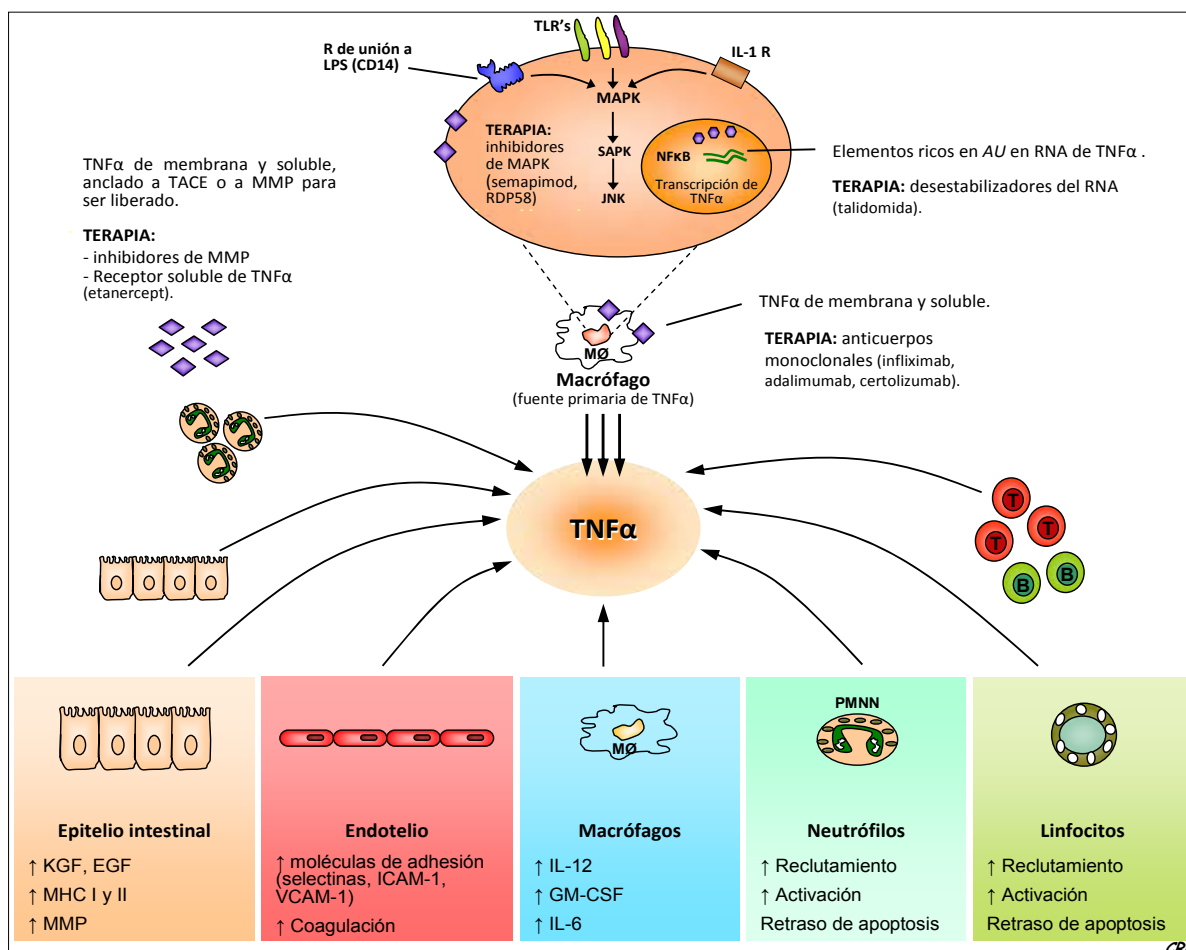


FIGURA 6: VÍA DEL TNFα - regulación, efectos y posibles dianas terapéuticas. El TNFα juega un papel central en la IBD y es una diana terapéutica prometedora.

EGF, factor de crecimiento epidérmico; GM-CSF, factor estimulador de colonias granulocito-macrófago; ICAM-1, molécula de adhesión intercelular 1; IL, interleucina; KGF, factor de crecimiento de queratinocitos; LPS, lipopolisacárido; MAPK, mitogen-activated proteína quinasa; MHC, complejo mayor de histocompatibilidad; MMP, metaloproteinasas de matriz; TACE, enzima convertidor de TNFα; VCAM1, molécula de adhesión vascular 1; SAPK, stress-activated proteína quinasa.

Adaptado de Korzenik JR y Podolsky DK, Nature reviews, 2006.

Esta citocina ha sido implicada en un gran número de patologías, incluyendo enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide, psoriasis, IBD, etc.), la diabetes tipo II y el cáncer [202]. En pacientes de IBD se detectan niveles elevados de dicha citocina en los lugares de inflamación [208], al igual que en sangre [209, 210], heces [121] y tejido intestinal [211].

La principal fuente celular de TNFα son los monocitos y los macrófagos activados, aunque las células T, B, NK y mastocitos también pueden producirlo [186, 212]. La cantidad de TNFα producida depende del estado de activación de la célula y del estímulo inductor. La estimulación de macrófagos por LPS es el mayor inductor de la liberación de TNFα [213]; el IFN-γ, sintetizado por los linfocitos T y NK, aumenta la síntesis de TNFα en dichos macrófagos. Generalmente considerada una citocina T_H1, recientemente se ha demostrado que el TNFα es también producido por linfocitos T_H17 [214].

Las funciones del TNFα se deben a su unión a dos receptores celulares diferentes, **TNFR1 (p55) y TNFR2 (p75)**. TNFR1 se encuentra expresado constitutivamente y une sobre todo el TNFα soluble, mientras que TNFR2 se localiza sobre todo en la membrana de

monocitos, linfocitos T, neutrófilos, células endoteliales y fibroblastos y una preferentemente el TNF α de membrana [215]. Estos receptores parecen desempeñar funciones opuestas: TNFR1 inhibe la migración, supervivencia y proliferación de las IEC's, mientras que TNFR2 las incrementa [198, 216]. Ambos receptores comparten vías de señalización (NF κ B y MAP quinasas), aunque sólo los efectos de TNFR1 concluyen en apoptosis [217].

Tanto en CD como en UC se encuentran niveles elevados de TNFR2 en células epiteliales colónicas [218] así como en linfocitos de *lamina propria* en CD activa [219]. Ambos receptores se han encontrado también en estado soluble en suero [220] y en líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide [206].

El TNFR1 es esencial para mediar las funciones protectoras de la citocina mientras que el TNFR2 desempeña un papel fisiológico en la supresión de las respuestas inflamatorias mediadas por TNF α [203]. Ratones TNFR1^{-/-} muestran mayores alteraciones de los mecanismos defensivos ante bacterias intracelulares que los ratones TNFR2^{-/-} [186, 203]. Se ha sugerido que TNFR2 está implicado en la patogenia de la colitis por TNBS (ácido trinitrobenzeno sulfónico), mientras que TNFR1 ejerce una función protectora de dicha colitis T_H1 [219, 221]. Pese a manifestar funciones opuestas, *Stillie* y *col.* apuntaron recientemente que ambos receptores contribuyen de forma similar o redundante a la colitis inducida por DSS (sodio dextrano sulfato) [217]. Sin embargo, *Mizoguchi et al.* demostraron recientemente que en animales RAG (desprovistos de linfocitos), el TNFR1 desempeña un papel protector en la colitis aguda por DSS mientras que el TNFR2 la agrava [222].

La creación de animales deficientes en el gen de TNF α así como el empleo de anticuerpos anti-TNF α han generado resultados contradictorios en los modelos de inflamación intestinal por TNBS (la deficiencia de TNF α protege en este modelo) y DSS (el bloqueo permanente de TNF α exacerba dicha colitis en la fase aguda, aunque resulta beneficioso en su fase crónica) [223-225]. Esta variabilidad observada en modelos animales sugiere que el TNF α actúa a través de mecanismos diferentes en ambos modelos o que juega un papel más importante en otros aspectos, como la reacción frente a las bacterias, más que en los procesos inflamatorios tempranos de dicha colitis. En consonancia con este concepto el tratamiento anti-TNF empleado en humanos no exacerba la patología pero sí es capaz de incrementar el riesgo de infecciones [129].

Por todos estos motivos se han desarrollado diversas terapias para la IBD basadas en la administración de anticuerpos anti-TNF α [226, 227], anticuerpos frente su receptor soluble [228], *etc.* Sin embargo, y tal y como se apuntó anteriormente, la principal limitación es la aparición de efectos adversos tras su uso en terapia (infecciones, reacciones a la inyección, desórdenes autoinmunes, neoplasias, *etc.*) [128, 129, 206, 229]. Además, la existencia de polimorfismos en el gen del TNF α o sus receptores pueden limitar el éxito de estas terapias [215]. Asimismo, la principal desventaja de las estrategias existentes es que ninguna de ellas consigue circunscribir su acción en el entorno intestinal y, por tanto, las nuevas estrategias que se plantean han de ir encaminadas a alcanzar una actuación local en la zona intestinal.

2. MODELOS EXPERIMENTALES DE IBD EN ROEDORES

Los modelos experimentales de colitis han contribuido a unificar las hipótesis respecto a la patogenia de la IBD [134]. Estos modelos resultan indispensables, pese a no representar la total complejidad de la enfermedad humana y no reproducir con fidelidad su etiopatología y curso clínico [230]. A pesar de todo, son valiosos a la hora de estudiar aspectos importantes difíciles de abordar en humanos, como los mecanismos patofisiológicos en fases tempranas de colitis y el efecto de estrategias terapéuticas emergentes [230]. Asimismo, evidentes consideraciones éticas limitan la realización de estudios en humanos. Por tanto, conocer las características y limitaciones de los modelos animales disponibles es fundamental para obtener conclusiones extrapolables a la enfermedad humana.

El **modelo ideal de colitis** ha de ser similar a la IBD en cuanto a su etiología, fisiopatología, histopatología y espectro clínico. Debe ser un modelo reproducible, con una cinética predecible, y presentar un curso clínico parecido, una sensibilidad terapéutica y un perfil de mediadores inflamatorios similares a la IBD, e idealmente, ser un modelo espontáneo.

Los modelos de IBD en roedores se pueden clasificar en cuatro categorías: modelos *inducidos químicamente*, modelos *debidos a cambios genéticos* (bien espontáneos o inducidos), *modelos de colitis espontánea* y *modelos de transferencia celular* (ver tablas 4-7). Sólo en unos pocos modelos la enfermedad ocurre sin necesidad de manipulaciones exógenas.

2.1 Modelos inducidos químicamente

La colitis experimental puede inducirse en animales sanos mediante la exposición a sustancias químicas exógenas. En general, son modelos influenciados por la microbiota y por diversos componentes dietéticos [231]. Suelen ser altamente reproducibles y las principales especies empleadas, ratón y rata, son fáciles de manipular. En el caso de la colitis inducida por polisacáridos sulfatados (*e.g.*, DSS) se produce una fase aguda que se prolonga durante semanas, mientras que la reacción aguda producida por la instilación de enemas (*e.g.*, TNBS) se limita, a lo sumo, a 7 días. El proceso inflamatorio intestinal evoluciona sin aparición de nuevos brotes y termina resolviéndose espontáneamente.

MODELO	Área afectada	Inflamación	Respuesta	Semejanza	Referencias
TNBS/Etanol	Colon	A,C	Transmural T _H 1	CD	[232]
DSS	Colon	A,C	Superficial T _H 1/ T _H 2	UC	[233]
Oxazolona	Colon distal	A,C	Superficial T _H 2	UC	[234]
Iodacetamida	Colon	A,C	T _H 1	--	[235]
Indometacina	ID, colon	A,C	Transmural T _H 1	CD	[236]
PS-PG	Colon	A	Transmural T _H 1	CD	[237]
Ácido Acético	Colon distal, recto	A	T _H 1	UC/CD	[238]

TABLA 4: *Modelos de colitis inducida químicamente en roedores.*
A, aguda; C, crónica. PS-PG, polisacárido-peptidoglicano. ID, intestino delgado.

A continuación se detalla más extensamente el modelo de colitis inducida por DSS, ampliamente usado en investigación.

2.1.1 Colitis inducida por sodio dextrano sulfato

Este polisacárido sulfatado se administra en el agua de bebida produciendo una **inflamación aguda** en ratones, ratas y hámsters, tras una administración de un único ciclo de 5-7 días, o una **inflamación crónica**, generalmente tras varios ciclos repetidos de 5-7 días alternados con días de descanso de DSS (*i.e.*, 5-7 días de agua corriente). Originariamente, fue descrito por *Okayasu y col.* en 1990 [233] y, pese al transcurso de más de dos décadas, los mecanismos exactos implicados en el daño epitelial siguen siendo desconocidos. Recientemente, *Melgar y col.* [239, 240] describieron que la colitis aguda producida en ratones de la cepa C57BL/6 tiende a cronificar tras un único ciclo de DSS, a diferencia de lo que pasa en cepas como la BALB/c.

La variabilidad en la respuesta al DSS depende de: **1)** la cepa [239, 241, 242], **2)** el proveedor de los animales, **3)** el género de los animales [241, 243], **4)** la concentración de DSS [244], **5)** el peso molecular del DSS [245], **6)** la duración de la exposición al DSS [246] y **7)** la carga ingerida de DSS (*i.e.*, [volumen total ingerido x concentración de DSS]/peso corporal inicial del animal) [247]. Aún presentando todas estas variables, resulta un modelo suficientemente reproducible bajo las mismas condiciones experimentales.

El tipo de colitis se considera adecuado para probar nuevos conceptos de intervenciones terapéuticas [248] y para estudiar aspectos particulares de la inflamación intestinal. En este sentido y empleando este modelo experimental, *Melgar et al.* demostraron recientemente que la valoración de la eficacia de varios de los fármacos más frecuentemente utilizados para IBD arroja una gran concordancia con respecto a los resultados de los ensayos clínicos, por lo que se considera que el modelo tiene un alto valor predictivo [249]. En general se contempla como un modelo de UC, pese a que en fases tardías, la colitis crónica remeda en bastantes aspectos la CD humana (con presencia de múltiples agregados linfoides, lesiones discontinuas y transmurales y presencia de displasia) [246].

Como se apuntó anteriormente, se desconoce el mecanismo exacto por el que se induce la colitis, pero se sugiere una acción citotóxica directa sobre el epitelio del colon, con una función alterada de macrófagos por fagocitosis de DSS, así como un incremento de la exposición a antígenos por destrucción de la capa de mucina o barrera mucosa y afectación de la integridad de la barrera epitelial [250]. Esto predispone al aumento de la translocación de las bacterias intraluminales y la infiltración de neutrófilos y demás células inmunitarias que, junto con el potencial erosivo sobre la barrera intestinal y la inapropiada respuesta de los macrófagos, exacerba las lesiones intestinales [251].

Fenotípicamente, los animales colíticos muestran una significativa pérdida de peso, aparición de diarrea sanguinolenta, cambio de comportamiento (disminución de la ingesta, falta de acalamiento, estupor, lordosis, *etc.*), engrosamiento de la pared intestinal y

acortamiento colónico, lesiones que afectan a la mucosa y submucosa con presencia de ulceraciones, más evidentes en colon distal, edema e infiltración de células mononucleares, lesión de criptas y pérdida de la arquitectura normal de la mucosa, así como una moderada pero sostenida producción de citocinas proinflamatorias (IL-18, IFN- γ , IL-1 β , IL-12, TNF α , IL-17, etc.) [240, 252-254]. Cuando la administración de DSS se produce de forma cíclica (o en un único ciclo en la cepa C57BL/6) los ratones llegan a desarrollar lesiones crónicas que se pueden prolongar durante semanas después del periodo de exposición. Estas lesiones suelen caracterizarse por la presencia de prominentes folículos linfoides y displasia epitelial [239, 246, 255].

En este modelo, al igual que en otros, se pueden diferenciar dos fases: la **fase aguda y la fase crónica o de recuperación**. En la **fase aguda** se considera que la inmunidad innata desempeña un papel fundamental y las lesiones observadas se han correlacionado con el aumento de citocinas proinflamatorias derivadas de macrófagos (TNF α , IL-1 β , IL-6). Las células B y T (inmunidad adaptativa) no parecen ser necesarias para la inducción de la inflamación en este modelo [256], ya que es reproducible en ratones SCID (*severe combined immunodeficiency*, inmunodeficiencia severa combinada) [257]; sin embargo, recientemente *Melgar et al.* demostraron que los linfocitos T sí parecen ser necesarios en la fase aguda de la colitis por DSS en ratones C57BL/6 [240]. Es en esta fase aguda, donde el empleo del modelo resulta interesante para valorar los mecanismos de la inmunidad innata implicados en los procesos de regeneración tisular, así como de nuevas terapias que consigan acelerar este proceso [242, 258]. La **fase crónica**, que se produce después de varios ciclos de DSS en algunas cepas, de disminuir la concentración del hapteno, o bien alrededor de 2 semanas después tras parar su administración y pasar a agua normal en ratones C57BL/6 [239, 249], se caracteriza por una lenta reparación de la mucosa tras el extenso daño inicial. Esta fase se considera mediada por linfocitos que han sido activados por las citocinas proinflamatorias de la fase anterior [233]. Estos linfocitos secretan elevadas concentraciones de IFN- γ e IL-4, sugiriendo que ambos tipos de células, T_H1 y T_H2, juegan un papel patogénico en esta fase [242]. Además, datos más recientes sugieren la implicación de las células T_H17 en esta etapa, al igual que sucede en la IBD [259, 260].

También se ha demostrado que la microbiota ejerce un papel importante en el establecimiento de las lesiones. Se ha observado que la administración de antibióticos, prebióticos o probióticos consigue atenuar la capacidad nociva del DSS [261-264]. Este modelo permite además estudiar la secuencia inflamación-cáncer, ya que en fases más avanzadas y de forma parecida a lo que sucede en humanos, aparecen con elevada incidencia fenómenos neoplásicos en colon, como resultado de los propios mecanismos de regeneración tisular [233, 255]. Recientemente, se ha establecido una asociación clara entre el estrés y la reactivación de la colitis crónica por DSS en ratones [153], abogando aún más por sus similitudes con la IBD.

2.2 Modelos de colitis inducidos genéticamente

Son animales a los que se les ha provocado una delección genética (*knock-out*, KO, $^{-/-}$) o bien se les ha sobreexpresado un gen (transgénicos, *Tg*). Estos modelos permiten identificar cómo y porqué los defectos inmunológicos producen inflamación intestinal.

MODELO	Área afectada	Inflamación	Respuesta	Semejanza	Referencias
IL-2 $^{-/-}$	Colon	A, C	T _H 1	UC	[265]
IL-10 $^{-/-}$	ID, Colon	C	Transmural T _H 1(inicio)/ T _H 2 (final)	CD	[54]
CRF2-4 $^{-/-}$	Ciego, colon	C	T _H 1	CD	[266]
TCR $^{-/-}$	Colon	C	T _H 2	UC	[267]
TNF $^{\Delta ARE}$	Íleon>Colon	C	Transmural T _H 1	CD	[268]
STAT 3 $^{-/-}$	Ciego, colon	C	T _H 1	CD	[269]
MDR1a $^{-/-}$	Colon	--	Transmural T _H 1	--	[270]
Gai2 $^{-/-}$	Colon	C>A	T _H 1	UC	[271]
IKK γ /IKK $\alpha\beta$ $^{-/-}$	Pancolitis	C	T _H 1	CD	[272]
HLA-B27 <i>Tg</i>	ID, Colon	A, C	T _H 1	--	[273]
STAT 4 <i>Tg</i>	Íleon terminal, Colon	C	Transmural T _H 1	--	[274]
IL-7 <i>Tg</i>	Colon	A, C	T _H 1/ T _H 2	UC	[275]
DN N-cadherina <i>Tg</i>	ID, ciego	C	?	CD	[276]

TABLA 5: Modelos de colitis inducida genéticamente en roedores.

Actualmente, con el desarrollo de la tecnología de RNA de interferencia (*ver apartado 3.3.2*), los ratones KO no son la única posibilidad experimental de bloquear un determinado gen. Esta novedosa aplicación es capaz de silenciar un gen y puede convertirse en una herramienta potencial para el diseño de nuevos modelos de IBD [277].

2.3 Modelos de colitis espontánea

Representan la mejor opción para definir los factores genéticos que conducen a la inflamación de la mucosa y se aproximan más a la fisiopatología humana.

MODELO	Área afectada	Inflamación	Respuesta	Semejanza	Referencias
C3H/HeJBir	Íleon/Ciego/Colon	A, C	Superficial T _H 1	--	[278]
SAMP1/Yit	Íleon/Colon	C	Transmural T _H 1/ T _H 2	CD	[279]

TABLA 6: Modelos de colitis espontánea en roedores.

2.4 Modelos de transferencia celular

En este caso la inflamación es inducida transfiriendo poblaciones de células al tejido linfóide del huésped (generalmente animal SCID).

MODELO	Área afectada	Inflamación	Respuesta	Semejanza	Referencias
Células T CD4 ⁺ CD45RB ^{high} / SCID	Colon>Íleon	C>A	Transmural T _H 1	CD	[280]
HSP60 $^{-/-}$ T CD8 ⁺ / TCR $^{-/-}$ o SCID	ID>Colon	No depende de bacterias	T _H 1	CD	[281]

TABLA 7: Modelos de transferencia celular en roedores.

Aunque no existe un modelo animal que reproduzca todas las características clínicas y patogénicas de la IBD, cada uno de ellos permite explorar distintos aspectos de los mecanismos responsables de la iniciación y perpetuación de la inflamación intestinal crónica [230]. La mayoría de modelos sólo afectan al intestino grueso y no al intestino delgado (localización preferencial de las manifestaciones clínicas de la CD). De todas maneras, en muchos de estos modelos, al igual que en pacientes con CD, pueden encontrarse células T con fenotipo T_H1/T_H17 activadas por IL-12/IL-23 en las lesiones inflamatorias, generándose una respuesta inmune local con producción de IFN- γ , TNF α e IL-17. Probablemente el mejor modelo para representar la ileítis propia de la CD es el modelo SAMP1/YitFc porque la inflamación es más severa en el ileon terminal y el fenotipo aparece espontáneamente [230]. El inconveniente de los modelos espontáneos, transgénicos o genéticamente modificados, es que en su mayoría dependen de factores ambientales (flora entérica) y su manifestación y severidad pueden llegar a ser altamente variables por este motivo [230] o incluso necesitar varios meses hasta que dicha colitis se instaure (KO IL-10). Es por este y otros motivos (coste, tiempo, reproducibilidad, etc.) por el que se emplean más comúnmente modelos animales como los inducibles (DSS, TNBS) que, a pesar de tener limitaciones, son asequibles y reproducibles, por lo que resultan muy adecuados para probar nuevas estrategias terapéuticas.

2.5 CD1 versus BALB/c versus C57BL/6

Considerado como un reactivo biológico, el animal de laboratorio ha de poder garantizar un nivel de calidad óptimo, el cual viene determinado por sus características fenotípicas, resultado de la interacción del genotipo y el ambiente. Dado que en un animalario el ambiente es una variable relativamente controlada, la genética del animal juega un papel clave a la hora de definir su fenotipo. Dentro del amplio abanico de cepas (consanguíneas o no) existentes, hoy en día, se pueden destacar algunas por su extensa utilización en multitud de estudios.

CD1: cepa no consanguínea (*outbred*) usada en farmacología y toxicología. El origen de esta cepa proviene de un stock de dos machos y siete hembras, albinos, provenientes de un stock no consanguíneo del *Dr. De Coulon* (Suiza) e importados por la *Dra. Clara Lynch* en 1926 (*Rockefeller Institute*). Por ser una cepa no consanguínea, se caracteriza por presentar una elevada variabilidad genética entre individuos del mismo grupo y una respuesta inmunitaria variable frente a proteínas foráneas. Generalmente se emplea como animal control y para la comparación de resultados [282]. Visitar <http://www.criver.com> para más información.

BALB/c: cepa consanguínea (*inbred*) empleada en la producción de anticuerpos y en otras muchas áreas. Esta línea fue iniciada por *Halsey J. Bagg* del *Memorial Hospital, New York*, en 1913 (BALB/c, proviene de **B**agg **AL**binos) [282]. Visitar <http://jaxmice.jax.org/strain/000651.html> para más información.

C57BL/6: cepa consanguínea (*inbred*) usada como base genética para la generación de líneas modificadas genéticamente. En el año 1920, *Abbie Lathrop* desarrolló una línea murina a partir de un macho y una hembra, elegidos exclusivamente por el color negro de su pelaje, y fue el *Dr. CC Little* el que creó esta cepa consanguínea a partir del cruzamiento de la hembra 57 y el macho 52 del stock de *Lathrop*. Actualmente es la cepa consanguínea más empleada y fue la elegida por el *International Mouse Sequencing Consortium* para la secuenciación del genoma murino. La respuesta inmunitaria de esta cepa es diferente a la de otras líneas consanguíneas como la BALB/c, respondiendo de forma opuesta al mismo patógeno: **C57BL/6 -predominio T_H1-** y **BALB/c -predominio T_H2-**) [282, 283]. Además, los ratones de la cepa C57BL/6 parecen ser más susceptibles a la colitis por DSS (y no por TNBS), mientras que en ratones BALB/c ocurre a la inversa [252].

Visitar <http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html> y <http://www.harlan.com> para más información.

2.6 Paradigma de elección

El empleo de los diferentes modelos animales de IBD nos ha permitido aprender algunas lecciones fundamentales: en *primer lugar*, sabemos que dicha patología puede ser originada por factores independientes y diferentes (administración de sustancias, delección de genes, transferencia celular, *etc.*); en *segundo lugar*, el trasfondo genético del animal influye en la gravedad y localización de la inflamación (*e.g.*, C57BL/6 *versus* CD1); en *tercer lugar*, la colitis no se produce en ausencia de bacterias intestinales; y *por último*, los componentes del sistema inmune implicados en el reconocimiento de la microbiota intestinal son necesarios para el desarrollo de IBD (TLR's, NOD, *etc.*).

Por lo descrito anteriormente, se puede concluir que el modelo experimental de inflamación intestinal ha de estar bien caracterizado, y resulta idóneo cuando muestra alteraciones clínicas, histológicas, fisiopatológicas, bioquímicas e inmunológicas similares a las de la IBD. Es evidente que un solo modelo es incapaz de englobar las múltiples causas y alteraciones que se encuentran en la enfermedad humana. Por tanto, si es posible, resulta de vital importancia emplear diversos modelos cuando se trata de probar nuevas estrategias terapéuticas. En definitiva, la elección del modelo para ensayos terapéuticos dependerá del completo conocimiento del mismo, de la experiencia previa, del tiempo y los costes asumibles, de su disponibilidad (animales, reactivos, *etc.*) y de la propia molécula terapéutica a ensayar [284].

3. TERAPIA GÉNICA

3.1 Terapia génica y vectores

La **terapia génica** es una de las disciplinas de la biomedicina con más posibilidades para el desarrollo de nuevas herramientas dirigidas al tratamiento de enfermedades de origen genético o adquirido. En términos generales, se fundamenta en la introducción de material genético (ácidos nucleicos -DNA y RNA-) en una célula diana para aumentar o disminuir la expresión de un gen específico y así contrarrestar la enfermedad. El material genético transferido (*transgén*) es habitualmente un gen natural, aunque también puede ser un gen quimérico. Se dice que una célula está transducida cuando ha incorporado y expresado el transgén. Para facilitar la transducción, el material genético es empaquetado en constructos moleculares denominados *vectores*, que pueden ser virales o no virales [285]. Para que un gen sea expresado en una célula es necesario que su secuencia de DNA codificante esté apropiadamente unida a elementos reguladores, como los *promotores*. Los promotores génicos permiten que la expresión del gen se produzca en cualquier célula transducida (promotores universales) o sólo en determinadas células diana (promotores específicos de tejido). Además, los promotores pueden determinar una expresión continua o bien su actividad puede ser sensible a determinadas sustancias (fármacos como doxiciclina o tetraciclina), modulando así su función y permitiendo una expresión transgénica regulada [286].

Las características propias del vector y del promotor determinan la eficacia, la especificidad y la duración de la transducción, así como la aparición eventual de efectos adversos. Pero a la vez, la eficacia y la posible toxicidad también dependen del transgén, de la dosis de vector empleada, de la vía de administración y del tipo de célula diana [285].

El método más ampliamente utilizado para introducir genes exógenos en un organismo es el uso de virus como vectores (retrovirus [287], adenovirus (Ad) [288, 289], virus adeno-asociados [290], herpesvirus [291], etc.). Los virus varían enormemente en cuanto a capacidad de integración, eficiencia de transducción, nivel de expresión, tamaño máximo permitido del transgén, patogenicidad, inmunogenicidad, etc.; por ello, son agrupados en vectores de expresión de corta (Ad de primera generación) o de larga duración (retrovirus, virus adeno-asociados y Ad *gutless*) [285].

Para que la terapia génica sea aplicable en una patología crónica o hereditaria, se requiere la expresión del gen apropiado por períodos de tiempo prolongados, incluso toda la vida del enfermo. Por este motivo, el desarrollo de vectores seguros que consigan una expresión eficiente del transgén durante largos períodos de tiempo y que eviten la respuesta inmune del paciente es imprescindible para permitir su aplicación terapéutica *in vivo* [292, 293].

Dentro de la terapia génica, el empleo de vectores víricos con tropismo específico como vehículo de genes parece, *a priori*, más prometedor que el uso de vectores no virales,

que transportan el gen de elección mediante mecanismos fisicoquímicos con elevada bioseguridad pero poca especificidad por el tejido diana y baja eficiencia de transfección *in vivo* [285, 292, 294, 295].

El progreso de la terapia génica dirigida al intestino ha sido dificultado por la falta de vectores virales capaces de transferir eficazmente el gen de interés al tejido diana [285, 296-298].

3.1.1 Vectores virales: Adenovirus

Los **adenovirus** (Ad) son virus de doble cadena de DNA que protegen su material genético mediante una cápside proteica de geometría icosaédrica, sin envoltura exterior. La cápside está compuesta por 240 proteínas *hexon* y 12 proteínas *penton* localizadas en cada vértice. De la base de cada *penton* se extiende una *fiber* homotrimérica (dominios *knob*, *shaft* y *tail*) (ver figura 7) [299].

Su genoma está dividido en genes tempranos (*early genes*, E1-E4) que se expresan en primer lugar durante la replicación del Ad, y tardíos (*late genes*, L1-L5) que se expresan tras el inicio de la replicación. Estos últimos codifican las proteínas virales estructurales. Los genes tempranos están implicados en funciones variadas como la activación/represión de la transcripción de proteínas adenovirales, la inhibición de la apoptosis, la replicación del Ad, la inhibición de las respuestas inmunes innatas y adaptativas del huésped, *etc.* [300].

La familia *Adenoviridae* comprende más de 100 serotipos, de los cuales 52 son serotipos humanos y se encuentran agrupados en 7 especies (A-G) (ver tabla 8). La numeración de los Ad se realizó cronológicamente; por ello los de menor número se encuentran mejor caracterizados. Infechan una gran variedad de especies, incluyendo mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces. Los Ad salvajes causan principalmente enfermedades respiratorias y oculares leves, autolimitantes, en individuos inmunocompetentes; en cambio, en niños y adultos inmunocomprometidos la patología puede ser aguda e incluso letal [293, 299].

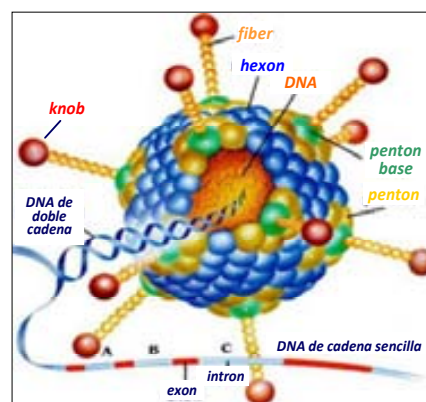


FIGURA 7: Visión esquemática de un adenovirus.

Adaptado de *Genetics of Infectious Diseases*, Ibay G, 2007.

Especie	Serotipo	Tropismo	Receptores	Seroprevalencia (%)
A	12,18,31	Entérico	CAR	35-70
B1	3,7,16,21,50	Respiratorio	CD46,CD80/86, HSPG, Factor X	2-15 (<i>Ad16,21,50</i>) 35-70 (<i>Ad3 y 7</i>)
B2	11,14,34,35	Renal	CD46,CD80/86, HSPG, Factor X	1-3 (<i>Ad11,34,35</i>) 18 (<i>Ad14</i>)
C	1,2,5,6	Respiratorio	CAR ,HSPG,MHC-I,VCAM-I, Integrinas	40-80
D	8,9,10,13,15,17,19,20,22-30,32,33,36-39,42-49,51	Ocular	CAR ,ácido sialico,CD46	3-44
E	4	Respiratorio, ocular	CAR	45
F	40,41	Entérico	CAR	41
G	52	Entérico	ND	ND

TABLA 8:

Clasificación de los adenovirus humanos. HSPG: Heparán sulfato proteoglicano; ND: no determinado. Adaptado de Sharma A y col., *Virus Research*, 2009 y Arnberg N y col., *Reviews in medical Virology*, 2009.

La entrada del Ad a la célula se produce mediante dos mecanismos: en el *primero*, el virus se ancla al receptor celular primario a través del dominio *knob* de la proteína *fiber*. Este anclaje específico virus-célula es vital para transducir eficientemente un tipo celular concreto y es considerado el determinante primario de su tropismo natural [301]. En el *segundo* paso, se producen interacciones secundarias entre componentes de la cápside (proteína *penton base*) y receptores de internalización [301], como las integrinas de la superficie celular ($\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$), para penetrar en la célula por endocitosis mediada por receptor.

El receptor del virus de Coxsackie (CAR) es considerado el receptor adenoviral primario; en mamíferos, CAR funciona como molécula de adhesión celular y posee una distribución tisular amplia y conservada evolutivamente [302]. En las células epiteliales, CAR se expresa preferentemente en la superficie basolateral [303] y, por tanto, los vectores adenovirales se consideran incapaces de infectar células polarizadas si el acceso ha de producirse a través de la superficie apical. Los virus clásicos (Ad5, del grupo C) no se unen eficientemente a enterocitos diferenciados y cuando son administrados, por vía intrarectal o intravenosa, transducen principalmente el hígado [304, 305].

En estudios *in vivo*, la distribución tisular inespecífica de los vectores adenovirales es debida a la amplia expresión de CAR, las α_v integrinas (receptor secundario) y el heparán sulfato (receptor terciario). En este sentido, la generación de un 'triple mutante' que no se une a ninguno de estos tres receptores mostró una disminución en la producción de citocinas proinflamatorias, sugiriendo que la unión del Ad a estos receptores está implicada en la inducción de las respuestas inmunes innatas [306, 307]. Además, se ha sugerido que el receptor de MHC de clase I puede actuar también como un receptor de alta afinidad para determinados vectores adenovirales [308]. Estudios más recientes han concluido que, a nivel *in vivo*, existen otros receptores de Ad con mayor afinidad que CAR [293, 299, 309, 310].

El empleo de Ad entéricos (Ad40 y Ad41, asociados a gastroenteritis infantiles) como vectores puede suponer un avance en la terapia génica dirigida al intestino, al incrementar la especificidad y la eficiencia de transducción en el epitelio intestinal [293, 299]. Sin embargo, la dificultad para amplificar estos Ad y el limitado conocimiento de su genoma ha potenciado la construcción de Ad pseudotipados -i.e., Ad quiméricos que resultan de la sustitución de proteínas *fiber/knob* de la cápside viral entre serotipos diferentes- [311].

Desgraciadamente, el uso de los Ad como vectores en estudios clínicos se ve limitado por varios factores: en *primer lugar*, el desarrollo de anticuerpos neutralizantes anti-Ad desde edades tempranas (sobre todo frente al grupo C); en *segundo lugar*, la mayoría de Ad administrados sistémicamente poseen un tropismo mayoritariamente hepático; en *tercer lugar*, la expresión adenoviral es transitoria (es máxima a los 3 días y dura hasta 4 semanas) y depende del *turnover* o recambio celular; *por último*, el empleo de dosis elevadas de Ad para aumentar su eficacia puede desencadenar efectos nocivos e incluso letales [312].

Pese a todo, los Ad siguen siendo los vectores más utilizados en ensayos clínicos pasando de un 20% en 1999 (con 40 estudios) a un 24% en el periodo 1999-2010 [313]. En la

actualidad, los adenovirus están siendo empleados en unos 400 ensayos clínicos, en estudios sobre el cáncer (65%), patologías cardiovasculares (8,5%), enfermedades infecciosas (8%), entre otros. Visitar <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/> para más información.

Este incremento es debido a los siguientes factores: **1)** el Ad puede infectar un elevado número de tipos celulares, tanto quiescentes como en división; **2)** las técnicas actuales de producción de Ad permiten modificar su cápside y de esta manera su tropismo celular [311, 314], **3)** son fáciles de producir en títulos elevados, **4)** son virus no integrativos, con lo que se evita la mutagénesis insercional, **5)** presentan una cierta estabilidad en sangre tras su administración sistémica y **6)** una alta capacidad para albergar DNA genómico relativamente grande [299].

El completo conocimiento de las interacciones Ad-receptor es fundamental para el diseño de vectores eficaces, seguros y específicos para los tejidos diana.

3.1.2 Adenovirus de primera, segunda y tercera generación

Para evitar la propagación y efectos adversos de los virus se han de generar virus deficientes en la replicación, que puedan ser usados como vectores en terapia.

Los vectores adenovirales de **primera generación** son deficientes en la región E1 (primera región del Ad en ser transcrita). Más tarde, para incrementar la bioseguridad de estos vectores se eliminó la región E3, lo cual consiguió aumentar también su capacidad para incorporar material genético a su genoma (de 5,1 a 8,2 Kb de DNA). La región E3 juega un papel importante en la evasión de los mecanismos de defensa del huésped frente a una infección adenoviral al inhibir las respuestas inmunes innatas y adaptativas, pero no resulta fundamental para la replicación del Ad. Aunque no son replicativos, los vectores de primera generación desencadenan respuestas inmunes en el huésped tanto celular, mediada por linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ citotóxicos, que limita la expresión del transgén, como humoral que limita la eficacia de las readministraciones [292, 313].

Los Ad de **segunda generación** se construyeron para tratar de solucionar algunos de los problemas de inmunogenicidad de los Ad de primera generación. Se combinaron diferentes deleciones de genes de las regiones tempranas (E1+/-E3 y E2/E4) aumentando sustancialmente la capacidad del Ad hasta 14 Kb de DNA. Aunque generaron grandes expectativas, su aplicación *in vivo* causaba problemas similares a los de los vectores de primera generación [313]. Otra mejora en el diseño de vectores adenovirales fue la generación de Ad sensibles a la temperatura; estos Ad podían replicarse *in vivo* a 32°C pero no a la temperatura fisiológica de 37°C [315].

Cada vez que se suprimía un gen del Ad era necesaria la creación de nuevas líneas celulares capaces de permitir su propagación y amplificación *in vitro*. Así, la primera línea celular creada fue la HEK293 (células humanas embrionarias de riñón) transformadas con la región E1 [316], lo cual permitía la generación de partículas competentes en la replicación y el Ad era capaz de multiplicarse en ausencia del gen E1 propio.

Los Ad de **tercera generación** (*helper-dependent* o *Ad gutless*) son Ad delecionados de todos sus genes, salvo de los implicados en su empaquetamiento. Como no se han podido generar líneas celulares que complementen todos los genes del Ad para su propagación en cultivo es necesario un virus *helper*. Los Ad *gutless* son altamente eficaces, pueden albergar hasta 36 Kb de material genético, la duración de la expresión del transgén es muy elevada (más de 10 meses en ratón o un año en babuinos) [317-319], y la respuesta inmunitaria que generan en el huésped es menor que la de los Ad de primera y segunda generación. La limitación de su empleo en clínica radica en la dificultad de eliminar la contaminación con el Ad *helper* [313].

3.1.3 Efectos adversos de los Ad

Como se ha mencionado anteriormente, el inconveniente fundamental de los vectores adenovirales es que inducen una elevada respuesta inmune dosis-dependiente, que limita la expresión del transgén e imposibilita las readministraciones. Los Ad deficientes en la región E1 son considerados excelentes vehículos para terapia génica, porque pueden transducir una gran variedad de tejidos sin el riesgo de integración en el genoma del huésped. El Ad5 es el empleado más frecuentemente como vector en ensayos clínicos, pero es sabido que su tropismo es principalmente hepático. Por tanto, sus posibles aplicaciones terapéuticas quedan prácticamente restringidas a este órgano. Además, tienen limitaciones debido a su tendencia a desarrollar cierto grado de toxicidad e inmunogenicidad [320-323].

Los Ad de primera generación inducen **tres fases de inflamación**. El sistema inmune innato es responsable de las dos primeras, mientras que tanto el sistema inmune innato como el adaptativo son responsables de la última fase [300] (ver figura 8).

La **primera fase** de la inflamación es promovida por la cápside viral y se inicia antes de que comience la expresión de las proteínas virales, a los pocos minutos tras la administración del Ad. Esta fase implica el reconocimiento y unión del Ad a la superficie celular y desencadena una respuesta IFN tipo I (IFN- α y β , principalmente; citocinas que actúan como primera línea de defensa frente a infecciones víricas y con funciones efectoras en el desarrollo de la inmunidad adaptativa) y la expresión de una amplia variedad de quimiocinas y citocinas proinflamatorias (IFN- γ , IL-6, TNF α , IL-8, etc.) [300]. La **segunda fase**, que comienza poco después de que el Ad haya sido internalizado (pico máximo de actividad a las 6 horas post-administración), depende de la expresión de los genes virales y, posiblemente, del propio transgén [300]. En esta fase intervienen activamente los macrófagos y las DC's, como nexos entre la inmunidad innata y la adaptativa. La liberación en esta fase de determinadas quimiocinas, como la IP-10 (proteína interferón inducible), genera el reclutamiento de linfocitos T y polariza la reacción a una respuesta citotóxica de tipo T_H1. En la **tercera fase** ocurre el reconocimiento inmune del Ad y del transgén [300]. Esta última fase sucede varios días después de la administración (4-6 días aproximadamente) y puede generar grandes secuelas en el huésped e incluso ser mortal [294, 312]. La activación del sistema inmune adaptativo es más rápida tras una reinfección con el mismo patógeno,

debido a la *memoria inmunológica* [292]. La respuesta inflamatoria generada es dependiente de la dosis y de la vía de administración del Ad, así como del tipo celular o tejido diana, y varía entre especies e individuos [294, 312]. La modificación de ciertos componentes virales (cápside, genes de regiones tempranas, etc.) puede variar la intensidad de estas respuestas, haciendo que el efecto inflamatorio global sea menor [300].

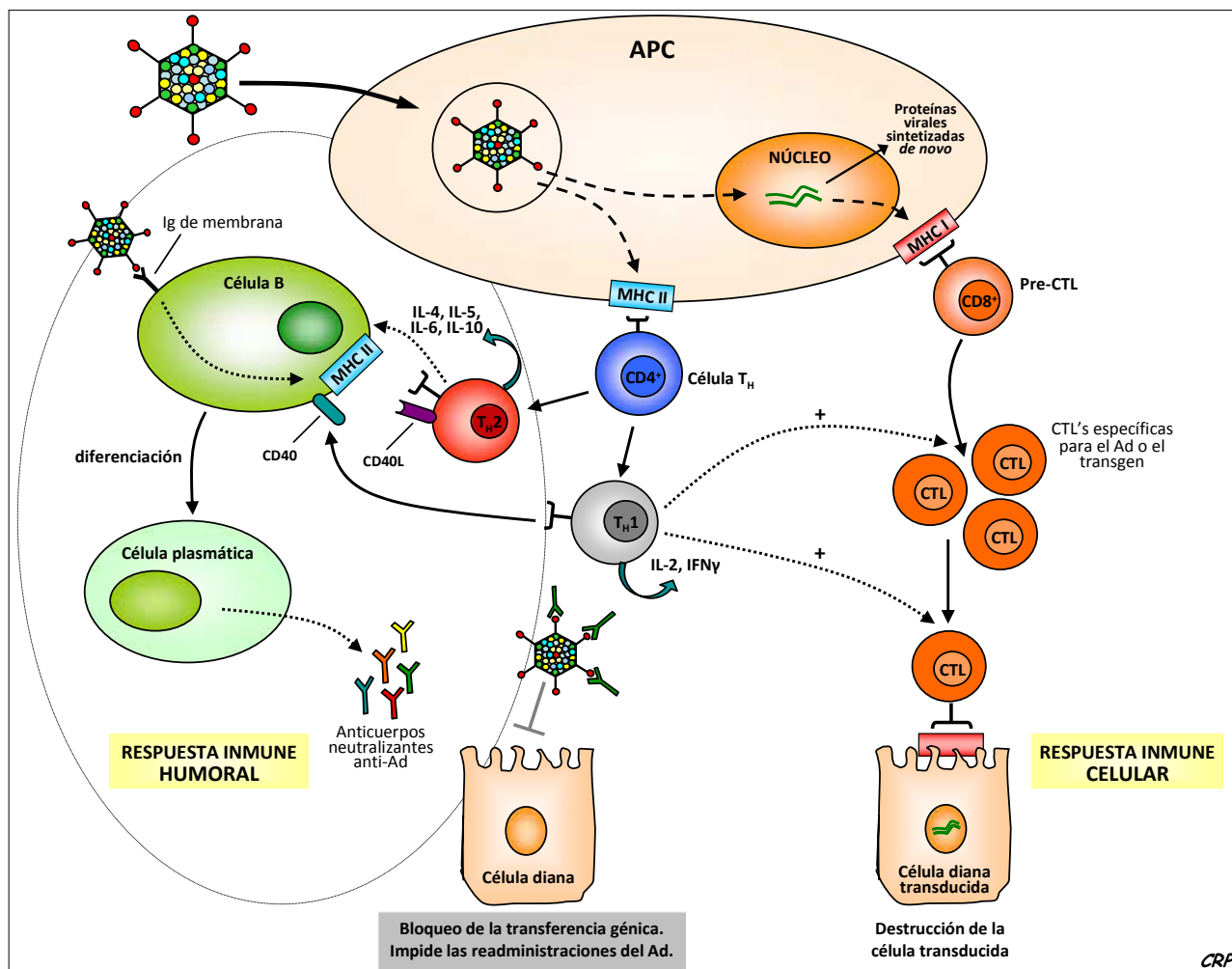


FIGURA 8: Activación del sistema inmune del huésped tras la administración adenoviral. Las células presentadoras de antígeno (APC) procesan las proteínas virales y del transgen sintetizadas *de novo* y las presentan a linfocitos CD8⁺ mediante el MHC de clase I. Estas células forman linfocitos T citotóxicos (CTL) que destruyen específicamente las células diana transducidas. La proliferación de las células CD8⁺ es también estimulada por las células CD4⁺ helper (T_{H1}), activadas por epítomos del Ad, presentados por el MHC de clase II. Además de la respuesta inmune celular, las CD4⁺ participan también en la activación de la respuesta humoral. La unión del Ad a la célula B y la interacción con la célula T CD4⁺ helper activada induce la diferenciación de las células B a célula plasmática y la subsiguiente producción de anticuerpos neutralizantes específicos anti-Ad, que impiden las futuras readministraciones de Ad del mismo serotipo.

Adaptado de Schagen F. et al, *Critical reviews in Oncology/Hematology*, 2003.

Como se ha comentado previamente, la administración intravenosa de Ad5 produce liberación de citocinas y quimiocinas proinflamatorias de forma dosis-dependiente [324]. Estas alteraciones, así como la inducción de una trombocitopenia aguda y consuntiva (sugestiva de la existencia de una coagulopatía intravascular diseminada), la activación de células endoteliales, la inducción de genes proinflamatorios en el hígado y la pérdida de células de Kupffer, son algunas de las toxicidades conocidas de la terapia adenoviral sistémica [325-327]. La infiltración leucocitaria en el hígado junto con la existencia de respuestas

inmunes adaptativas específicas frente a determinadas proteínas de la cápside adenoviral (mayoritariamente hacia la proteína *hexon*) y frente al propio transgén son también responsables de la toxicidad adenoviral [325, 327, 328].

Se ha descubierto que el promotor citomegalovirus (CMV) contiene elementos de respuesta frente NFκB, que estimulan la activación de genes inflamatorios y por tanto exacerban la inflamación preexistente [320, 327], apareciendo como otro mecanismo implicado en la toxicidad adenoviral.

Además, se ha demostrado que los Ad de primera generación promueven la supervivencia de las células transducidas mediante el aumento de señales antiapoptóticas *in vitro* [329]. Esto puede contribuir a la toxicidad de larga duración observada *in vivo*.

3.1.4 Alternativas para disminuir los efectos adversos

Durante años se ha tratado de encontrar mecanismos para evitar la toxicidad derivada del empleo de vectores adenovirales en ensayos terapéuticos, barajándose diferentes alternativas.

En primer lugar y de manera más sencilla, al **reducir la dosis** del Ad administrado se pueden obtener menores toxicidades, puesto que muchos de los efectos adversos observados son dosis-dependiente [323, 330]. El inconveniente de esta técnica es, que hasta que los macrófagos y las células de Kupffer no están saturados de Ad, no comienza la transducción de los hepatocitos [292].

El uso alternado de **serotipos diferentes** de Ad, tales como el Ad40 o Ad41 entéricos [304, 305, 331] (*ver capítulo 3*), así como el empleo de serotipos con menor seroprevalencia en humanos o de Ad no humanos, suponen otras opciones ventajosas [292, 332, 333]. Esta alternativa permite emplear vías locales de administración (oral, rectal) para así obtener un tropismo específicamente intestinal evitando una afectación sistémica no deseada. La generación de Ad modificados con tropismo específico hacia el tejido diana puede prevenir la aparición de efectos adversos, al esquivar la vía natural de entrada y así no estimular el NFκB y la subsiguiente respuesta proinflamatoria [334]. Además, este sistema puede incrementar la eficacia del vector y permitir, a su vez, una importante reducción en la dosis adenoviral necesaria.

Alternativamente, el uso de **vectores adenovirales de segunda o tercera generación** puede reducir las toxicidades y las respuestas inmunes del huésped frente al Ad [292, 300, 335, 336]. Se han estudiado diferentes modificaciones de proteínas de la cápside y de genes tempranos. Este esfuerzo ha sido suscitado por el intento de mejorar la eficacia de transducción de los Ad y minimizar la toxicidad y las respuestas inmunes, al tratar de reducir la replicación adenoviral, la cual ha sido considerada durante décadas como agente causal de los efectos deletéreos observados [337].

El empleo de **promotores específicos de tejido** (*e.g.*, de células epiteliales intestinales, como los promotores sucrasa-isomaltasa [338] o el promotor *L*-piruvato quinasa

modificado [339]) representa otra opción, al conseguir esquivar la respuesta inmune del huésped dirigida hacia el transgén. Aunque estos promotores suelen ser más débiles que el promotor clásico de CMV, el hecho de ser tejido-específico permite alcanzar una expresión local incluso tras una administración sistémica. Por tanto, esta técnica compensa la promiscuidad del vector (Ad5) con la especificidad del promotor. Además, el uso de promotores que no se expresen en APC's puede ser aplicado para evitar la respuesta inmune humoral anti-Ad [292].

También se ha demostrado que las toxicidades hepáticas inducidas por Ad de primera generación pueden ser minimizadas, aunque no completamente suprimidas, simplemente mediante el empleo de un **transgén tolerado** inmunológicamente por el huésped [320].

El uso de agentes **inmunosupresores o inmunoreguladores**, previo a la inyección del Ad, puede también reducir dichas toxicidades [292]. El pretratamiento con dexametasona disminuyó la generación de anticuerpos neutralizantes anti-Ad, sin reducir la eficacia de transducción [327]. Este hallazgo puede ser de gran valor y aplicabilidad en terapias en las que sean necesarias readministraciones continuas, como sucede en las enfermedades crónicas [340]. Es muy probable que la administración de vectores adenovirales codificantes de proteínas inmunomoduladoras, como la IL-10, pueda provocar una respuesta inmune disminuida en el huésped, tal y como se ha observado con la coadministración de anticuerpos anti-CD4 o anti-CD40L (CD40 ligando), o la Ig CTLA4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*, que bloquea las señales coestimuladoras entre las células T y las APC's) [341-344]. De todas maneras, el uso de agentes inmunosupresores combinados con la terapia adenoviral no resulta la alternativa de elección, por el riesgo de desatar fenómenos infecciosos a causa de la inmunosupresión sistémica que generaría.

La **tolerancia oral** supone otro mecanismo potencial para solventar estos problemas. Se ha demostrado que la administración por vía oral de proteínas de la cápside adenoviral genera una disminución de las respuestas humoral y celular anti-Ad en roedores, resultando por tanto, en readministraciones eficaces y bien toleradas [292, 345].

Una alternativa adicional implica la regulación de la expresión adenoviral con las técnicas inducibles **TET ON/TET OFF** (*tetracycline-controlled transcriptional activation*) [346]. Estas técnicas ofrecen un amplio rango de ventajas, desde una firme regulación *on/off*, ausencia de efectos pleiotrópicos o inespecíficos, una expresión génica estrechamente regulada en respuesta a variaciones en la concentración de los inductores y rápidamente detectable. A estas ventajas hay que sumar el hecho de que los inductores más habituales están bien caracterizados (tetraciclina o doxiciclina).

En conclusión, la inhibición de las respuestas inmunes frente a los Ad es compleja debido a la interacción de multitud de mecanismos; la inhibición de alguno, pero no de todos, puede exacerbar la inflamación, en vez de atenuarla [300]. Este efecto proinflamatorio puede ser de gran valor para estudios sobre el cáncer o el desarrollo de nuevas vacunas, pero nunca para patologías inflamatorias crónicas como la IBD. Por tanto, el completo conocimiento de

las interacciones entre el Ad y el sistema inmune del huésped es crucial para el desarrollo de vectores de terapia génica eficaces y seguros.

3.2 Terapia génica no viral: Plásmidos

La capacidad de introducir genes en tejidos de mamíferos de forma eficiente y de generar cantidades suficientes de los productos de los mismos es crítica para el avance de muchas áreas de conocimiento, como los estudios de biología molecular, de la función y regulación génica, estudios de la estructura y función proteica, tratamiento de enfermedades, desarrollo de vacunas de DNA, *etc.*

Las posibles limitaciones derivadas del empleo de virus como vehículo de terapia génica se pueden soslayar mediante el uso de **DNA 'desnudo'** (*i.e.*, plásmidos, pDNA's) como vector.

Esta alternativa, desarrollada durante la década de los '90, presenta algunas **ventajas**, comparada con los vectores víricos: **1)** el pDNA es más sencillo de obtener y preparar, **2)** permite alcanzar grandes cantidades de DNA, **3)** su almacenamiento y conservación son más fáciles [347-349] y, **4)** algunos pDNA's consiguen esquivar las limitaciones de la terapia adenoviral en cuanto a efectos adversos y toxicidad, al no promover el desarrollo de respuestas inmunes en el huésped [295, 350, 351].

Existen muchos estudios demostrando una gran eficiencia de expresión de genes *reporter* mediante la administración de pDNA's por distintas vías y en diferentes tejidos, como músculo [352, 353], hígado [347], pulmón [354], corazón [355] y piel [356]. La mayor limitación con la que se encuentran, es que requieren una administración local regional o un procedimiento quirúrgico y que, en ocasiones, el nivel resultante de expresión del transgén es relativamente bajo y restringido al lugar de inyección. En todos estos estudios, en ningún caso se detectaron signos graves de toxicidad, hepática o sistémica, siendo una herramienta de terapia génica que se muestra segura y de fácil obtención.

Hickman y col. fueron los primeros en mostrar expresión transgénica en hígado tras la inyección de pDNA's directamente en el parénquima hepático de gatos y ratas [347]; pero la expresión era bastante localizada en el área de inyección y prácticamente nula en zonas más distales. *Budker y col.* inyectaron una solución hipertónica de pDNA en la vena porta y observaron que la oclusión parcial de los vasos hepáticos eferentes resultaba imprescindible para lograr una expresión transgénica eficiente (*i.e.*, transfección del 1% de hepatocitos en ratón) [357]. Más tarde, *Zhang y col.* administraron retrógradamente pDNA en hígado a través de la vena hepática y el conducto biliar en ratón, rata y perro [358]. Esta administración retrógrada aumentó el éxito hasta alcanzar un 10% de transfección de hepatocitos. Se observó también que había una correlación directa entre la cantidad expresada del transgén y la presión hidrostática ejercida en el hígado tras la inyección. Además, la expresión del transgén era uniforme en todo el parénquima, a diferencia de lo que ocurría con la administración local realizada por *Hickman y col.* Las limitaciones de la técnica

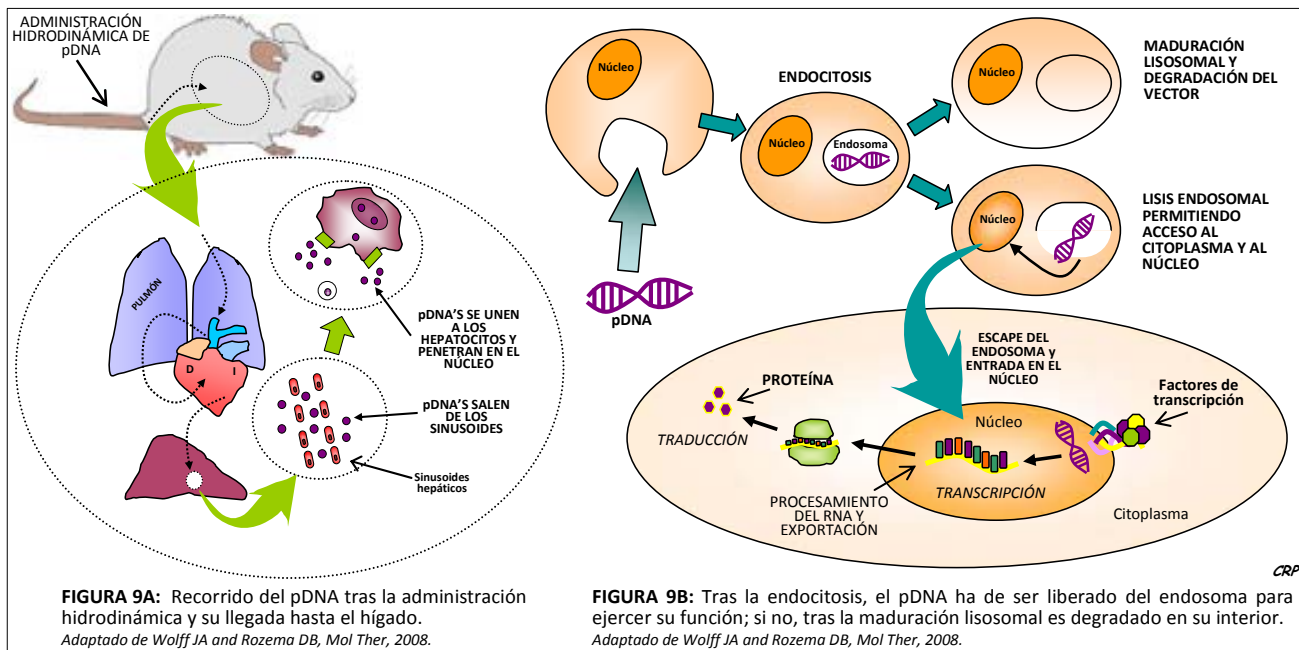
de Zhang y col. eran la necesidad de administrar las moléculas directamente en los vasos hepáticos (*i.e.*, vena hepática o vena porta a través de la vena cava inferior) junto con la oclusión temporal del flujo de salida y, por tanto, de un experimentador con suficiente destreza quirúrgica, para así conseguir transfectar el hígado de forma exclusiva [358, 359].

En 1999, la investigación biomédica en el campo de la transfección hepática sufrió un cambio radical gracias al descubrimiento de una nueva técnica, que surgió con la intención de solucionar estos problemas, la **administración hidrodinámica**. Esta técnica consiste en la inyección intravenosa (venas coccígeas) de un gran volumen de pDNA (100 mL/kg) en un corto periodo de tiempo, nunca superior a 7 segundos en ratón [349]. Es una técnica eficiente, capaz de transfectar el 40% de los hepatocitos sin la necesidad de técnicas quirúrgicas y ha resultado ser la más eficaz a la hora de obtener los mayores niveles de expresión del transgén [349, 359].

3.2.1 Administración hidrodinámica de pDNA's

En condiciones normales, cuando se inyecta por vía intravenosa el pDNA de forma lenta por el método denominado '*convencional*' (1 mL de solución de pDNA/kg de peso corporal), las moléculas de DNA entran en el torrente circulatorio y llegan al corazón, donde son distribuidas a otros órganos. Asimismo, la presencia de nucleasas sanguíneas hace que las moléculas de pDNA sean rápidamente degradadas en la circulación (en pocos segundos se deja de detectar pDNA en hígado) [349, 360]. Tras la degradación, estas moléculas son eliminadas del torrente circulatorio para ser atrapadas por macrófagos hepáticos mediante la unión a receptores tipo *scavenger* [360, 361].

Por el contrario, cuando se efectúa una administración hidrodinámica de pDNA's (*ver figura 9*), dicha solución de pDNA se acumula en la vena cava inferior y, cuando el volumen administrado supera el gasto cardíaco, se produce un aumento de la presión hidrostática en dicha vena, proporcional al volumen y a la velocidad de inyección, que fuerza retrógradamente al pDNA hacia los tejidos conectados directamente con la vena cava (hígado, bazo, riñón, corazón). Como el hígado es el órgano más grande y de estructura expansible, la mayor parte del pDNA administrado alcanzará este órgano en una dirección opuesta a la circulación normal sanguínea, lo cual expone directamente los hepatocitos a las moléculas de pDNA. Se ha demostrado que la inyección hidrodinámica induce una irregularidad temporal de la función cardíaca, creando una situación similar a un fallo congestivo derecho transitorio. Esto produce el incremento en la presión venosa hepática, y ocasiona un deterioro en las fenestraciones de los sinusoides (se ensanchan), así como la generación de un gradiente de presión a través de la membrana plasmática de los hepatocitos (mayor fuera que dentro de la célula), lo que facilita la entrada del pDNA desde los vasos al interior celular. En poco tiempo, el sistema cardiovascular se adapta al volumen de líquido inyectado y se restablece la homeostasis [362].



La incorporación del transgén en dichas células es resultado de la creación de poros en su membrana (*hidroporación*) por el aumento de la presión hidrostática ejercida [359, 362]. Así pues, dos horas tras la administración hidrodinámica, el pDNA sigue siendo detectable en hígado. El pico máximo de expresión del transgén se alcanza a las ocho horas tras la inyección con cualquier dosis de pDNA administrada y la expresión del producto del transgén es máxima al cabo de un día tras la inyección. Posteriormente, esta expresión comienza a disminuir (hasta un mes después) y alcanza la saturación con unos 5 µg de pDNA inyectados en ratón, pero mantiene niveles detectables hasta 6 meses después de la administración hidrodinámica [363]. Se ha descrito que, aproximadamente, el 40% de los hepatocitos expresan el transgén [349]. Esto es debido, presumiblemente, a que la formación de los poros es transitoria (dura unos 15 segundos), y sólo se produce en determinadas áreas hepáticas (mayor en el área alrededor de la vena hepática que alrededor de la vena porta) [362], atrapando las moléculas de pDNA en su interior.

La inyección hidrodinámica de pDNA y la incorporación de genes en el hígado es capaz de superar tres barreras fisiológicas: en primer lugar, la *barrera espacial* existente entre el lugar de inyección -venas caudales- y el órgano diana -hígado-; en segundo lugar, la *barrera estructural* de las fenestraciones endoteliales hepáticas que previenen el paso de moléculas grandes al parénquima de dicho órgano y, por último, la *barrera de la membrana plasmática de los hepatocitos*, que limita la entrada de moléculas hidrofílicas como el DNA, el RNA y las proteínas [362].

Con el descubrimiento de la administración hidrodinámica, Liu y col. [349] resolvieron algunos de los problemas de esta tecnología de terapia génica; es decir, lograron una expresión de mayor duración e intensidad. Desde entonces se han probado diferentes modificaciones químicas en la secuencia del pDNA con la intención de mejorar aún más los niveles alcanzados de expresión transgénica, la duración y eficacia de dicha expresión, y

reducir las toxicidades halladas con algunas formulaciones de pDNA's (como los pDNA *CpG-rich* o los *lipoplex*) que permitan las múltiples readministraciones [364-366].

3.2.2 Factores críticos de la administración hidrodinámica de pDNA's

Existen diversos factores críticos a la hora de realizar este tipo de administración que han de ser tenidos en cuenta para alcanzar una expresión satisfactoria del transgén:

1) Volumen de la solución de pDNA a administrar: se ha demostrado que el nivel resultante de expresión del transgén en diferentes órganos aumenta a medida que se incrementa el volumen de solución de pDNA administrado [349].

2) Peso corporal del animal: correlacionado con el volumen de sangre corporal y la capacidad cardíaca. Lo óptimo para conseguir un mayor nivel de expresión es inyectar aproximadamente un volumen equivalente al 8-12% del peso corporal del animal [349].

3) Tiempo de inyección del pDNA: cuanto menor sea éste, más eficiencia y mayor nivel de expresión del transgén [349]. Lo óptimo es que la inyección se haga en menos de 7 segundos en ratón.

4) Peso molecular (PM) de la molécula de DNA administrada: se requiere que la molécula sea de gran PM. Se observó que para $PM < 1000$ Da la administración hidrodinámica no alcanzaba expresión significativa en hígado [367].

5) La experiencia del técnico es un requisito fundamental a la hora de realizar la administración hidrodinámica de pDNA. Además, el empleo de **agujas adecuadas** adaptadas al tamaño de la cepa de ratón resulta crítico (aguja de 30-gauge para C57BL/6, 27-gauge para BALB/c o CD1, etc.) [365].

3.2.3 Factores limitantes de los pDNA's en terapia

Al igual que para la terapia adenoviral, el **turnover** celular supone un factor limitante a la hora de conseguir una expresión génica sostenida en el tejido diana mediante el empleo de pDNAs. Para muchos de estos vectores sintéticos, las células diana (*i.e.*, células epiteliales pulmonares, musculares, endoteliales, así como los hepatocitos) son células completamente diferenciadas y presentan un recambio celular bajo.

La **inactivación del promotor** es el factor más limitante a la hora de conseguir una expresión génica sostenida [365]. La actividad transcripcional del promotor clásico de CMV es robusta pero susceptible de inactivarse con el paso del tiempo [368]. Han sido evaluados promotores alternativos al de CMV, incluyendo promotores tejido-específicos e híbridos del CMV, demostrando una persistencia mayor [365, 369].

Otro factor limitante para alcanzar niveles de expresión altos y sostenidos es la posible **toxicidad y respuesta inmune** del huésped frente a algunas formulaciones de pDNA's. Estos efectos adversos son dependientes de las **características fisicoquímicas de la molécula** de pDNA y han sido únicamente demostrados tras administración de formulaciones estabilizadoras de pDNA's con policonjugados (*lipoplex*) o en plásmidos no libres

de nucleótidos inmunoestimuladores CpG [370]. Curiosamente, la administración intravenosa aislada de lípidos catiónicos o de pDNA's no causó toxicidad ni respuestas inflamatorias, indicando que es el efecto de la combinación pDNA-lípido catiónico lo que resulta desfavorable [371]. También se ha demostrado que la administración intravenosa de 'DNA desnudo' es menos tóxica que la de *lipoplex* [372], y que el mantenimiento de una única secuencia CpG en la molécula del pDNA sigue estimulando el sistema inmune del huésped a través de su reconocimiento por el TLR9 [369, 373, 374]. La inmunización mediante el empleo de vacunas de pDNA ha sido una herramienta eficaz a la hora de conferir inmunidad protectora en varios modelos animales de enfermedades infecciosas y cáncer [375]. El DNA plasmídico, al igual que el DNA bacteriano, contiene secuencias CpG no metiladas (también conocidos como CpG's inmunoestimuladores o CpG islands) con mayor frecuencia que el DNA de mamíferos en los que, si se encuentran, están en forma metilada [376]. Se ha demostrado que la producción de citocinas proinflamatorias inducida por la administración intravenosa de pDNA *lipoplex* no CpG-free se ve disminuida significativamente en ratones KO para TLR9 [376]. Asimismo, los pDNA's con secuencias inmunoestimuladoras CpG son capaces de promover respuestas humorales anti-pDNA o anti-transgén, con el consiguiente posible desarrollo de respuestas autoinmunitarias en el huésped [370]. También ha sido probado, que la administración repetida de *lipoplex* resulta ineficaz, por la respuesta inflamatoria generada tras la primera inyección, y que los *lipoplex* que carecen de CpG's en su secuencia permiten readministraciones más efectivas [377].

Otro factor limitante en vistas a una aplicación en humanos es el **tipo o vía de administración**. Ya que la administración hidrodinámica es la mejor opción a la hora de conseguir transfecciones elevadas y sostenidas, pero que a la vez no resulta segura ni aplicable como tal en humanos, se han realizado diferentes aproximaciones para conseguir eficacias de transfección similares. Los primeros estudios diseñados en animales de mayor tamaño implicaban el aislamiento quirúrgico del hígado [358], aunque esta técnica no resultaba práctica si se necesitaban readministraciones de la molécula. En estos estudios se obtuvieron los mejores niveles de transfección mediante la oclusión temporal de los vasos hepáticos eferentes. Más tarde, *Eastman y col.* desarrollaron diversos métodos clínicamente practicables para transfectar eficientemente el hígado en conejos usando técnicas mínimamente invasivas mediante el empleo de catéteres y balones de oclusión, sin necesidad de aislar quirúrgicamente el hígado [378]. En este ensayo, la administración de grandes volúmenes de pDNA (límite de 15 mL/kg en conejos) a la velocidad máxima de 10 mL/seg consiguió niveles de transfección adecuados y similares a los obtenidos en ratón tras administración hidrodinámica. Aún se han de superar algunos de los obstáculos que derivan de este tipo de administración con vistas a una posible aplicación clínica (gran volumen, tiempo de inyección, etc.) pero diferentes autores han propuesto rutas alternativas para soslayar estos inconvenientes. El acceso a través del colédoco o de la vena cava (mediante colangiopancreatografía o desde la vena femoral, respectivamente) podrían ser rutas de administración más accesibles de cara a su aplicación en humanos [379].

Por último, y como se comentó previamente, la **concentración del pDNA** también supone un factor limitante, al alcanzarse niveles saturables de expresión transgénica [363].

3.2.4 Estrategias para disminuir las propiedades inmunoestimuladoras

Como se ha apuntado anteriormente, la estimulación del sistema inmune por parte de los vectores de terapia génica es deseada sólo en condiciones puntuales, pero nunca para el tratamiento de patologías inflamatorias. Por ello, se ha tratado de encontrar soluciones para disminuir las propiedades inmunoestimuladoras de las moléculas de pDNA, que se resumen a continuación:

La **metilación de las secuencias CpG** en un pDNA es capaz de disminuir la producción de citocinas proinflamatorias *in vitro*; por desgracia, este cambio ocasiona también una menor eficacia de transfección [380] y sin suprimir completamente la estimulación del sistema inmune, sugiriendo la implicación de otros mecanismos y receptores en el reconocimiento de moléculas de pDNA y de sus motivos inmunoestimuladores CpG [306].

La **eliminación de las secuencias CpG no esenciales** (*e.g.*, secuencias flanqueantes al origen de replicación) resultó una aplicación mucho más ventajosa puesto que disminuía la actividad proinflamatoria de la molécula, a la vez que aumentaba la duración de la expresión del transgén [366, 370].

En vista de que la capacidad inmunoestimuladora del pDNA es proporcional a la cantidad de CpG's existentes en la secuencia, la eliminación completa de dichas CpG's, creando **plásmidos CpG-free**, dio resultados aún mejores [295]. De todas maneras, existen determinados motivos carentes de capacidad inmunoestimuladora en las secuencias CpG: los oligonucleótidos CGG, CCG o CGCG no poseen características inmunoestimuladoras y, además, son capaces de inhibir la actividad inflamatoria de otros nucleótidos CpG [370].

Una alternativa desarrollada en 2004 por Liu y col. denominada '**safeplex**', basada en la coadministración de **inmunosupresores**, consigue minimizar las respuestas proinflamatorias de los lipoplex y, por tanto, también aumenta los niveles de expresión transgénica [374].

La entrada del pDNA en el endosoma requiere un ambiente intracelular acidificado para que la vía de señalización de los CpG's inmunoestimuladores funcione (*figura 9B*). El empleo de inhibidores de la señalización de CpG's (como los inhibidores de la acidificación endosomal cloroquina y bafilomicina) bloquea la producción de citocinas inducida por CpG's en leucocitos *in vitro* [381]. La **cloroquina** bloquea un paso temprano de esta vía de señalización, impidiendo la generación de radicales libres y la activación de NFκB por parte de los CpG's en dichos leucocitos [381, 382]. Las concentraciones necesarias de cloroquina para disminuir los efectos adversos específicos son tan bajas (nanomolares o micromolares) que suponen una ventaja en comparación con el empleo de los inmunosupresores antes mencionados [370].

Así pues, la optimización de la estructura del pDNA es crucial para maximizar la transferencia génica *in vivo*. El pDNA que contenga un único motivo CpG seguirá estimulando la respuesta inmune en el huésped. La expresión sostenida del transgén, en ausencia de

inflamación, puede ser alcanzada mediante la administración hidrodinámica, o equivalente, de pDNA's completamente libres de secuencias CpG; estos niveles pueden ser suficientes para alcanzar un efecto terapéutico.

Para maximizar el potencial terapéutico de las terapias génicas no virales se han de mejorar los niveles de expresión así como su duración. Desafortunadamente, existen muchas barreras extra- e intracelulares (receptores *scavenger*, membranas celular y nuclear, componentes del citoesqueleto, *etc.*) que limitan dicha transferencia génica. El desarrollo de métodos que permitan minimizar estos impedimentos físicos para la internalización de las moléculas de pDNA conseguirá aumentar las eficacias de transfección en células diana tanto *in vitro* como *in vivo* [383].

3.3 Terapia génica no viral: siRNA's

El desarrollo de las técnicas de silenciación génica o antisentido comenzó en la década de los '70, cuando Zamecknik y *col.* descubrieron que la expresión específica de un producto génico podía ser inhibida usando una secuencia corta complementaria de DNA [384]. Con el paso del tiempo han sido desarrolladas diferentes estrategias orientadas hacia la inhibición de la expresión post-transcripcional secuencia-específica de determinados genes: oligonucleótidos antisentido (AS-ONs), ribozimas (RZs), enzimas DNA (DNAzimas), y los sistemas de RNA de interferencia (RNAi) [385].

La interferencia de RNA se fundamenta en la complementariedad entre el RNA y su RNA mensajero (mRNA) diana, para así conseguir la destrucción de dicho mRNA, y hace referencia a la silenciación génica post-transcripcional mediante RNA de cadena sencilla (ssRNA) o de cadena doble (dsRNA) [386]. Aunque sólo ha transcurrido una década desde su descubrimiento en el nemátodo *C. elegans* [387], esta técnica se ha convertido en el *standard* para la investigación en diferentes laboratorios. Sus pioneros recibieron en el 2006 el Premio Nobel de Medicina por sus descubrimientos, y en 2002 fue considerada '*Breakthrough of the Year*' por la prestigiosa revista *Science* [388]. En la actualidad existen diversas herramientas de RNAi: *short-interference* RNA (siRNA), *short-hairpin* RNA (shRNA) y *micro*-RNA (miRNA), y todos pueden inhibir la expresión del producto génico diana [389].

La RNAi es un fenómeno natural, conservado evolutivamente y que fue considerado una peculiaridad cuando se observó por primera vez en petunias [390]. Este mecanismo existe en muchos organismos como medida de protección de la integridad del genoma (protección frente a virus y transposones). Una de las mayores aplicaciones de la RNAi es que permite estudiar la función de un gen en un momento determinado y durante un largo periodo de tiempo, así como las consecuencias que sufre una célula cuando una proteína no es producida en ella (proceso conocido como '*genética reversa*'). Es un fenómeno ubicuo en eucariotas y, actualmente, es paradigma de elección para estudiar los mecanismos de regulación de expresión génica en plantas, hongos y animales. Su amplia aplicabilidad en investigación y su compatibilidad en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, a la vez que sus

múltiples ventajas (rapidez, precisión, especificidad, coste moderado) la convierten en una herramienta clave para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos, la creación de animales genéticamente modificados (*knock-out*) y para estudiar la función de determinados genes [391].

En el año 2000 se logró por primera vez la interferencia de RNA en embriones murinos [392, 393]. Estos estudios, sin embargo, parecían ser de utilidad limitada, puesto que empleaban dsRNA y las células somáticas de mamífero exhiben una respuesta inespecífica hacia dichos dsRNA -a través de mecanismos proteína quinasa dsRNA-dependientes (*RNA-dependent protein kinase, PKR pathway*), que frenan la traducción inespecíficamente-. Un año después, *Tuschl y col.* demostraron que las secuencias siRNA podían ser empleadas para inducir RNAi específicamente en mamíferos mediante siRNA's sintetizados químicamente [394, 395]. El descubrimiento de que la administración de siRNA's era capaz de poner en marcha un mecanismo endógeno natural y producir silenciación génica específica fue toda una primicia.

3.3.1 Mecanismo de acción de la RNAi y diseño de siRNA's

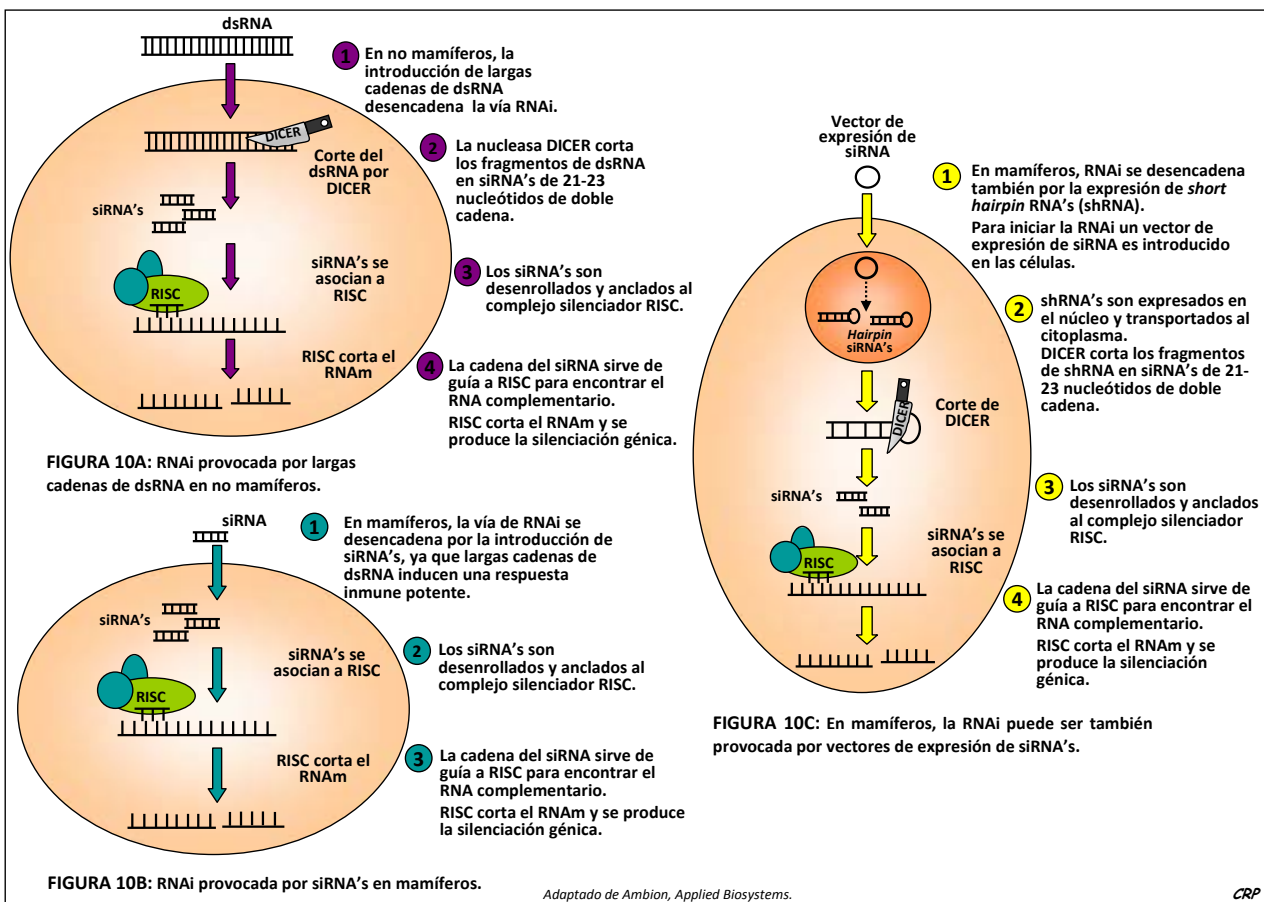
La RNAi está basada en el reconocimiento de dsRNA como moléculas 'no propias' e incluye diferentes mecanismos de silenciación como la degradación del RNAm, la metilación del promotor o modificaciones de la cromatina [396].

Su mecanismo de acción es doble (*ver figura 10*): el **primer paso** conlleva la acción de la enzima DICER (endoribonucleasa tipo III), ubicada en eucariotas y conservada evolutivamente. Esta enzima corta largas cadenas de dsRNA en moléculas siRNA de 21 a 23 pares de bases, con terminaciones características en 3'. A nivel *in vitro*, una DICER recombinante puede ser usada para generar siRNA's; posteriormente, estas pequeñas moléculas pueden ser incorporadas en las células. En un **segundo paso**, el siRNA pasa a formar parte de RISC (*RNA-induced silencing complex*), una endonucleasa encargada de desenrollar el dsRNA para que su cadena antisentido (*antisense*) pueda unirse al mRNA complementario o diana de silenciación, evitando así cualquier interacción de este mRNA con la maquinaria celular de traducción, originando su destrucción [391]. La cadena *sense* o '*passenger*' del siRNA ha de tener la misma secuencia que el mRNA diana; esta cadena no es anclada al complejo silenciador RISC. La cadena *antisense* o '*guide*', es anclada a dicho complejo, y su función es guiarlo hacia el mRNA complementario a silenciar [397].

El siRNA es producido en la célula, bien tras la introducción de un vector de transcripción adecuado [398], o bien tras transfección del siRNA purificado *in vitro* (*ver figura 10A y B*). En el primer caso, largas cadenas de dsRNA son introducidas en la célula mediante transfección liposomal o a través de su entrada por pinocitosis, o por transcripción *in vivo* mediante las cadenas sentido y antisentido [391]. Después, en la célula el siRNA es producido cuando estas largas cadenas de dsRNA son procesadas por DICER, generando los siRNA's característicos. Se cree que cualquier dsRNA que supere los 26 nucleótidos puede inducir RNAi [399]. La longitud del dsRNA es crítica en experimentos en mamíferos, ya que dsRNA

mayores de 30 pares de bases inducirán una respuesta inmune IFN tipo I que concluirá en apoptosis por estrés celular [399]. Como se verá más adelante, es posible esquivar esta respuesta inmune mediante el empleo de siRNA's producidos *in vitro* (ver apartado 3.3.3).

Otra alternativa es sintetizar dsRNA del segmento del gen a silenciar y predigerirlos con DICER *in vitro*, creando un *pool* de moléculas de siRNA del tamaño apropiado. Este *pool* puede ser después transfectado en la célula para mediar RNAi. siRNA's de tan solo 19 nucleótidos producidos *in vitro* también son capaces de inducir RNAi [391]. Esto puede ser de utilidad cuando se desconoce la secuencia exacta del siRNA necesaria para silenciar el gen. En mamíferos, los siRNA's pueden ser también generados mediante el empleo de vectores de transcripción que codifican *cassettes* de expresión de siRNA's (shRNA's), producidos *in vitro* o *in vivo* [391] (ver figura 10C).



En conclusión, se puede decir que el dsRNA, y más concretamente el siRNA, debe inactivar el mRNA diana, y que es la secuencia del dsRNA la que determina el lugar preciso en el que el mRNA será cortado. Es de vital importancia que el dsRNA no perturbe la expresión de cualquier otro gen y para ello es necesaria una gran especificidad entre secuencias, para evitar posibles efectos inespecíficos, como se detallará posteriormente. Cualquier gen puede ser silenciado por un siRNA, pero no todos los siRNA's son capaces de silenciar un mRNA [391, 400].

Las **reglas Tuschl** comprenden una serie de normas para conseguir un diseño eficaz de siRNA's. Algunas de ellas son: los siRNA's han de ser dúplex de 21-22 nucleótidos, con terminaciones UU 3' simétricas; el mRNA diana ha de comenzar por AA; el contenido de nucleótidos GC ha de ser \leq al 50% del total de la secuencia; se han de identificar dianas que difieran en, al menos, 3 ó 4 bases con cualquier otra secuencia de tamaño similar en el genoma; se han de diseñar diferentes siRNA's por diana debido a la impredecibilidad de los mismos [391, 394, 401]. Además, es importante evitar la inclusión de cuatro bases nitrogenadas iguales seguidas (*e.g.*, AAAA, CCCC, *etc.*), ya que esto desencadenaría la terminación prematura de la transcripción [391].

Un posible problema es que los efectos de la RNAi son poco duraderos, a no ser que se realicen readministraciones [387]. En términos generales se acepta que el efecto de silenciación dura entre 5 y 7 días [391] y que la transfección con concentraciones de siRNA subnanomolares consigue alrededor del 90% de reducción en los niveles del RNAm *in vitro* [402, 403]. Una alternativa para lograr una silenciación específica, efectiva y de mayor duración sería la combinación de siRNA's con vectores virales de alta eficacia, como los Ad [403, 404], con vistas a su uso en terapia.

Es muy importante tener en cuenta que la maquinaria de la RNAi puede verse saturada, ya que tanto siRNA's como miRNA's endógenos comparten algunos de los elementos involucrados en su procesamiento [405]. Los miRNA's son responsables de procesos biológicos importantes como la proliferación, la apoptosis y la diferenciación celular [406, 407], por lo que conviene evaluar si la terapia RNAi, a largo plazo, puede afectar estas funciones. Finalmente, es imprescindible buscar posibles homologías con otros genes o secuencias (*i.e.*, realizar *BLAST homology search*) para evitar los efectos *off-target*, como se verá más adelante (*ver apartado 3.3.6*), y diseñar siempre controles negativos con secuencias aleatorias (siRNA *scramble*) del siRNA diana. Este siRNA *scramble* (siRNA scr) ha de tener la misma longitud y composición nucleotídica que el siRNA diana, pero al menos 4 ó 5 sustituciones de bases nucleotídicas y no ha de ser homólogo a ningún otro gen [391].

Como molécula terapéutica englobada dentro del grupo conocido como '*mucosal drugs*', el siRNA ha de cumplir una serie de **requisitos**: ha de tener un mecanismo de acción específico, así como una acción de inicio rápido y de larga duración tras una única administración [386]. La duración de la silenciación génica viene determinada por la potencia de la molécula, la degradación intracelular de la misma y el recambio natural (*turnover*) de las células tratadas. Estos factores son comunes a todas las herramientas de terapia génica comentadas anteriormente.

Por tanto, sus características generales son: alta especificidad, elevada potencia (más que con los nucleótidos antisentido) y gran versatilidad, lo que implica la posibilidad de silenciar diferentes genes en un mismo individuo (*terapia combinada*) [408] (*ver tabla 9*).

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Examinar la función génica en el tiempo. Altamente específico con el gen de interés. Examinar qué genes están involucrados en qué vía/s. Altamente conservado evolutivamente. Más eficaz que ribozimas en la destrucción del mRNA. Menor toxicidad que oligonucleótidos antisentido. Fácil de administrar en mamíferos. Apropiaada para identificar nuevas dianas terapéuticas. Potente: es más efectiva a bajas concentraciones que los oligonucleótidos antisentido.	Coste: oligos de RNA son más caros que oligos de DNA. Necesidad de gran entrenamiento del técnico. dsRNA>30 p.b. estimulan respuestas inmunes innatas (IFN tipo I); desencadena apoptosis. Algunas células (neuronas) son resistentes a la RNAi. A veces, resultados poco reproducibles. Algunos siRNA's no funcionan (necesarias pruebas ensayo/error). Falta de controles positivos o negativos adecuados. Comparación difícil entre laboratorios (diferentes protocolos). Oligos RNAi sintéticos han de ser extremadamente puros (sin contaminación con sales, purificados por HPLC, etc.)

TABLA 9: **Ventajas y desventajas de la RNAi.** Extraído de Farrel RE, *RNA interference: Targeted gene silencing*, 2005.

3.3.2 Aplicaciones de la RNAi

La aplicabilidad de la tecnología RNAi es muy extensa, desde el tratamiento de infecciones virales (influenza A [409], virus del herpes simple [410], hepatitis B y C [411], VIH [412]) hasta el cáncer [413, 414], enfermedades neurodegenerativas (ataxia espinocerebelar, enfermedad de Huntington, Parkinson, Alzheimer, etc. [415, 416]) y oculares [417], así como el tratamiento de enfermedades inflamatorias (e.g., artritis reumatoide) o el shock séptico (por inhibición de TNF α) [418]. Pero no sólo la terapia puede verse beneficiada por las múltiples ventajas de la RNAi; la ingeniería genética animal en el diseño de transgénicos (i.e., diseño de animales KO mediante RNAi) puede ser una herramienta valiosa, ya que permitiría generar animales de experimentación con diferente grado de deficiencia génica, modulando así los fenotipos patogénicos, y ser más similar a los perfiles genéticos humanos [419, 420]. Esta herramienta puede ser también aplicada en ganadería con finalidades terapéuticas y/o productivas [404, 421].

3.3.3 Modificaciones químicas de siRNA's

La estabilización de los siRNA's sintéticos para prevenir la degradación por nucleasas es un prerequisite para su aplicación terapéutica *in vivo*. Las modificaciones del grupo 2'-hidroxilo en la ribosa (con grupos 2'-O-metil (OMe), 2'-fluoro, etc.) no sólo retienen la funcionalidad de la molécula, sino que además previenen el reconocimiento del siRNA por el sistema inmune [403, 422-424] y aumentan la estabilidad de la molécula al minimizar su degradación por las nucleasas sanguíneas [397]. La incorporación selectiva de tan solo dos grupos 2'-OMe guanosinas, uridinas o adenosinas (no en las citidinas) en la cadena *sense* de una molécula de siRNA altamente inmunoestimuladora es suficiente para inhibir la respuesta inmune de tipo IFN I y la producción de citocinas proinflamatorias en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) y en ratones *in vivo* [423]. Por el contrario, se ha observado que estas modificaciones 2'-OMe en la cadena *antisense* de un dúplex de siRNA pueden impactar sobre la actividad silenciadora [423].

Otras estrategias diseñadas para mejorar el transporte del siRNA hacia el interior celular son la conjugación de la molécula con diferentes ligandos, como esteroides o lípidos,

haciendo la molécula más hidrofóbica [422] y facilitando su entrada a través de la membrana celular. La administración sistémica de siRNA's no ha de ser sinónimo de transporte de la molécula hacia todos los tipos celulares del organismo; por ello, la conjugación del siRNA con colesterol ha sido empleada para transportarlo específicamente al hígado tras su administración intravenosa [422], puesto que el hígado está implicado en el procesamiento de lípidos y esteroides.

Asimismo, se han realizado una serie de modificaciones químicas en las moléculas con la intención de lograr un control espacial y temporal de la inducción de la RNAi (*e.g.*, mediante el empleo de grupos fotolábiles que reducen la actividad del siRNA hasta que la modificación química es eliminada por exposición a la luz) [397, 425].

3.3.4 Vías de administración de siRNA's

La vía de administración de siRNA's tiene diferentes implicaciones. Afecta a la dosis total de siRNA necesaria, así como a su eficaz distribución tisular. También está implicada en la severidad de los efectos adversos potenciales, y en la necesidad de emplear modificaciones químicas o agentes que faciliten su distribución. La vía intravenosa es la que alcanza una mayor distribución tisular, pero también, mayores efectos adversos potenciales. Por tanto, vías alternativas como la intraperitoneal, subcutánea o diferentes vías locales con absorción mucosa (oral, rectal, vaginal) han de ser consideradas como alternativa, y más aún si se desea un efecto superior y de mayor concentración en el tejido diana (*ver figura 11*). Esto permite, además, emplear dosis menores y minimizar los posibles efectos adversos. La administración hidrodinámica de siRNA's ha sido también empleada [426, 427].

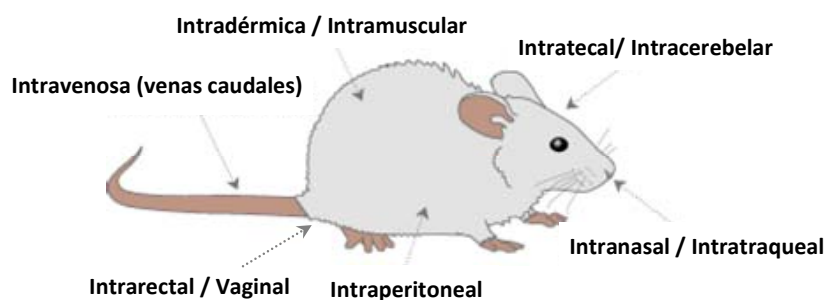


Figura 11: Estrategias de administración de siRNA's *in vivo*.

3.3.5 RNAi e inmunidad

Pese al éxito obtenido con esta tecnología, se ha demostrado que determinadas secuencias siRNA son capaces de activar respuestas inmunes innatas en monocitos humanos, de forma concentración-dependiente, dando lugar a la producción de TNF α , por activación de NF κ B y MAPKK (*mitogen-activated protein kinase kinase*), e inducción de respuestas IFN tipo I [396]. Por estos motivos es de vital importancia probar cualquier secuencia siRNA terapéutica en monocitos humanos, previamente a la realización de ensayos *in vivo* con animales de experimentación, a fin de buscar posibles efectos inespecíficos. Además, algunos siRNA's son capaces de estimular el sistema inmune innato de mamíferos de forma secuencia-específica y

tipo celular-específica, por medio de la activación de diferentes TLR's, y tanto ssRNA (cadenas *sense* y *antisense*) como dsRNA pueden desencadenar dicha activación [428-430].

La activación de esta respuesta inmune innata es desencadenada parcialmente por dsRNA's, lo cual origina la regulación ascendente de diferentes vías de señalización JAK-STAT (Janus tirosina kinasas-transductores de señales y activadores de la transcripción), produciendo la activación de genes estimuladores de IFN's de tipo I en el núcleo [431].

De los 13 TLR's descritos en mamíferos, 3 interactúan específicamente con las moléculas de RNA: **TLR3, TLR7 y TLR8** [432, 433] (*ver tabla 2*). Dichos TLR's se expresan en los endosomas, y requieren la correcta maduración y acidificación endosomal para que su señalización sea funcional [434].

Diversos estudios han demostrado que la inhibición de la acidificación de la membrana endosomal consigue evitar la estimulación del sistema inmune innato, de forma dosis-dependiente, al evitar la funcionalidad de dichos TLR's e impedir el reconocimiento de los siRNA's [430]. Este reconocimiento por los TLR's tiene lugar en los endosomas antes de que el siRNA entre en el citoplasma. Por tanto, si el siRNA fuera capaz de entrar en el citoplasma sin pasar previamente por el endosoma, podría llegar a evitarse la activación del sistema inmune sin eliminar la capacidad silenciadora de la molécula. La electroporación, que consigue situar el siRNA en el citoplasma directamente, podría resultar útil para ello [430].

Los mamíferos han desarrollado también mecanismos de reconocimiento de RNA's citoplásmicos independientes de TLR's. Estas respuestas están mediadas por PKR, la 2',5'-oligoadenilatosintetasa (OAS) y RIG-I (gen I inducible por ácido retinoico), todas implicadas en la defensa antiviral. Estas moléculas también reconocen dsRNA's y pueden desencadenar respuestas IFN tipo I, independientemente de la secuencia del siRNA [431, 435].

Como se comentó anteriormente, el tipo de administración también determina la magnitud de estimulación del sistema inmune. Por vía intravenosa la estimulación a través de los diferentes TLR's es mayor que la conseguida mediante otras vías de administración (*e.g.*, electroporación). Además, diferentes formulaciones químicas (*e.g.*, siRNA's combinados con lípidos catiónicos) también son capaces de activar las respuestas inmunes innatas y de IFN tipo I [436, 437]. Estas formulaciones se emplean en un intento de mejorar la entrada del siRNA en la célula, al crear interacciones electroestáticas entre la molécula siRNA cargada negativamente y la carga positiva del lípido catiónico (*e.g.*, lipofectamina) y la membrana celular [438].

Existen diversos mecanismos que impiden el reconocimiento inmune de los siRNA's. En primer lugar, el uso de agentes que impidan su distribución y/o retención en los endosomas [439], la modificación de ciertos nucleótidos de su secuencia [85, 440], así como la inhibición de la maduración de los endosomas (con cloroquina o bafilomicina) [430].

El reemplazo de 2'-hidroxil uridinas por 2'-fluoro, 2'-deoxi o 2'-O-metil uridinas puede eliminar el reconocimiento de los siRNA's por los TLR's, a la vez que también consigue disminuir muchos de los efectos *off-target*, sin afectar la potencia de la molécula [424]. Judge

y *col.* [423] describieron que la modificación química 2'-OMe en una de las cadenas del siRNA dúplex es suficiente para bloquear la activación de los TLR's tanto *in vitro* (en PBMC's humanas) como *in vivo* (tras administración intravenosa en ratón) y, además, sus efectos inhibidores de mecanismos *off-target* resultaron ser más potentes que los logrados con la modificación 2'-fluoro [424]. Por tanto, ya que la incorporación selectiva de 2'-OMe resulta económica y no compromete a su funcionalidad, el empleo de dicha modificación química debería ser siempre contemplado para su aplicación *in vivo*. Se cree que esta modificación química esquiva el reconocimiento inmune gracias a un mecanismo evolutivo por el cual los receptores del sistema inmune son capaces de distinguir el RNA derivado de patógenos (no metilado) del RNA celular del huésped (metilado) [438].

Si bien la inducción del sistema inmune innato mediada por siRNA's es generalmente considerada como un efecto no deseado, es importante señalar que dicha estimulación puede resultar beneficiosa en terapia frente al cáncer y en enfermedades infecciosas víricas o en el desarrollo de vacunas, tal y como se ha mencionado anteriormente para las otras herramientas de terapia génica [441]. Además, el desarrollo de antagonistas de TLR's puede ser prometedor como agentes anti-inflamatorios e inmunosupresores. En este sentido, algunos de estos siRNA's no estimuladores del sistema inmune pueden ejercer dichos efectos al interferir con la señalización TLR [396, 430, 442].

3.3.6 siRNA's y efectos *off-target*

Los efectos *off-target* hacen referencia a dos fenómenos: en *primer lugar*, a las consecuencias de la estimulación inmune inespecífica (*comentado en el apartado 3.3.5*) y, en *segundo lugar*, al efecto que se produce cuando la molécula siRNA se hibrida parcialmente con un mRNA erróneo [397]. Por tanto, este último grupo se basa en la hibridación cruzada por complementariedad de bases nitrogenadas de una secuencia siRNA con otro mRNA diferente del diana, invalidando así la especificidad de la molécula. En otras palabras, es la destrucción de un mRNA celular que comparte cierta homología con la secuencia del siRNA, pero sin ser la diana original a la cual iba destinada la molécula. Estos efectos son debidos al desconocimiento de los parámetros que determinan el mínimo nivel de homología requerido para que los siRNA's medien la silenciamiento del mRNA diana [443] y ocurre principalmente cuando el siRNA actúa como un miRNA. Dúplex exógenos de siRNA's pueden funcionar como miRNA's y estos miRNA's, a su vez, pueden dirigir procesos *off-target* y regular a la baja muchos genes a través de interacciones con secuencias con una mínima homología (tan solo de 7 pares de bases en la cadena antisentido) [403, 444].

Los *microarrays* han sido empleados para identificar efectos *off-target* a nivel de la expresión génica y en una amplia escala del genoma, sobre todo en estudios *in vitro*. Para estudios *in vivo* y de forma más sencilla y menos costosa, la alternativa a los *arrays* es el empleo de dos o más secuencias diferentes de siRNA's frente a la misma diana; ambas secuencias tendrían que producir el mismo efecto biológico en el fenotipo. Este ensayo

parece necesario para asegurar que los resultados no están sesgados por los mecanismos *off-target* [403].

La mayoría de efectos *off-target* pueden ser minimizados disminuyendo la concentración del siRNA administrado; en cambio, la estimulación de una respuesta inmune IFN tipo I se produce también a bajas concentraciones de siRNA's [436]. Otras alternativas diseñadas para reducir estos efectos *off-target* son, aumentar la incorporación selectiva de la cadena *antisense* al complejo RISC (minimizando la de la cadena *sense*) o bien impedir la vía miRNA directamente [397]. En términos generales, esto se consigue, en el primer caso, mediante modificaciones químicas de la cadena *sense*, para así evitar su incorporación errónea a RISC [445]. Incluso, aunque la cadena *antisense* se una a RISC de forma específica y totalmente complementaria, el problema sigue siendo que los siRNA's pueden funcionar como miRNA's endógenos, como se ha comentado anteriormente [446]. Estos efectos, a su vez, pueden causar toxicidad [447], que una vez más puede ser disminuida mediante el empleo de modificaciones químicas (2'-OMe). Una última estrategia, diseñada por la compañía *Dharmacon RNA Technologies*, es la administración simultánea de cuatro dúplex de siRNA's diseñados frente a un mismo gen; así consiguen atenuar o 'diluir' los efectos *off-target*, ya que son diferentes para cada dúplex, pero manteniendo la actividad silenciadora específica; los efectos *off-target* globales de un *pool* de siRNA's se consideran menores que los de un siRNA aislado [397]. Visitar <http://www.dharmacon.com/> para más información.

Las **conclusiones** fundamentales que derivan del diseño de siRNA's terapéuticos son muchas, pero se resumen en [389]:

- Los efectos *off-target* son, en ocasiones, difíciles de identificar y de eliminar.
- La regulación específica a la baja de los genes diana puede no ser suficiente para conseguir el efecto terapéutico deseado.
- El nivel del mRNA puede no reflejar la expresión génica alcanzada.
- El nivel del mRNA necesariamente no se correlaciona con la cantidad de proteína.
- Los niveles de mRNA o proteína necesariamente no se correlacionan con su actividad.
- Los mecanismos de entrada del siRNA a la célula pueden ser diferentes *in vitro* e *in vivo*.
- No hay correlación demostrada *in vitro* / *in vivo*.
- Se desconocen las diferencias de respuesta especie-específicas.
- Se pueden generar vías compensatorias que enmascaran la eficacia de la silenciación.
- La bioseguridad de los siRNA's no ha sido confirmada en humanos.

REFERENCIAS

1. Russel MG, Stockbrugger RW. Epidemiology of inflammatory bowel disease: an update. *Scand J Gastroenterol* 1996;31:417-27.
2. Saro C, R.V. Epidemiología y factores de riesgo de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal. MA Gassull, F. Gomollón, A. Obrador, J. Hinojosa, eds. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal Ergón*, 2002.
3. Colombel J.F., H.J. Aspectos genéticos de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal. MA Gassull, F. Gomollón, A. Obrador, J. Hinojosa, eds. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Ergón*, 2002.
4. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-6.
5. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
6. Mendoza Hernández JL, Lana Soto R, Días-Rubio M. Definiciones y manifestaciones clínicas generales. MA Gassull, F. Gomollón, A. Obrador, J. Hinojosa, eds. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*, 3rd Edn Arán, 2007.
7. Pallone F, Monteleone G, Biancone L. Aspectos Inmunológicos de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal. MA Gassull, F. Gomollón, A. Obrador, J. Hinojosa, eds. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*, 2nd Edition Edn Ergón, 2002.
8. P.Nos Mateu, J.Hinojosa del Val. Criterios diagnósticos y clínicos de la enfermedad de Crohn. MA Gassull, F. Gomollón, A. Obrador, J. Hinojosa, eds. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*, 2nd Edn Ergón, 2002.
9. Geboes K, Peter van Eyken. Histopatología de la Enfermedad de Crohn. MA Gassull, F. Gomollón, A. Obrador, J. Hinojosa, eds. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*, 2nd Edn Ergón, 2002.
10. Sans Cuffi M, Panés Díaz J. Criterios diagnósticos de la colitis ulcerosa. MA Gassull, F. Gomollón, A. Obrador, J. Hinojosa, eds. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*, 3rd Edn Arán, 2007.
11. Geboes K, Jouret A. Histopatología de la colitis ulcerosa. MA Gassull, F. Gomollón, A. Obrador, J. Hinojosa, eds. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*, 2nd Edn Ergón, 2002.
12. B.Sicilia Aladrén, MA Gassull, F.Gomollón. Epidemiología de las enfermedades inflamatorias intestinales. Factores ambientales internos y externos en su patogenia. MA Gassull, F. Gomollón, A. Obrador, J. Hinojosa, eds. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*, 3rd Edn Arán, 2007.
13. Rodrigo L, Riestra S, Nino P, et al. A population-based study on the incidence of inflammatory bowel disease in Oviedo (Northern Spain). *Rev Esp Enferm Dig* 2004;96:296-305.
14. Braus NA, Elliott DE. Advances in the pathogenesis and treatment of IBD. *Clin Immunol* 2009;132:1-9.
15. Roth MP, Petersen GM, McElree C, Feldman E, Rotter JI. Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1989;97:900-4.
16. Podolsky DK. The current future understanding of inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002;16:933-43.
17. Henckaerts L., Vermeire S. Genética de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal. MA Gassull, F. Gomollón, A. Obrador, J. Hinojosa, eds. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*, 3rd Edn Arán, 2007.
18. Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:1075-81.
19. Gaya DR, Russell RK, Nimmo ER, Satsangi J. New genes in inflammatory bowel disease: lessons for complex diseases? *Lancet* 2006;367:1271-84.
20. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007;369:1627-40.
21. Bennett RA, Rubin PH, Present DH. Frequency of inflammatory bowel disease in offspring of couples both presenting with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1991;100:1638-43.
22. Lees CW, Barrett JC, Parkes M, Satsangi J. New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut* 2011.
23. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996;379:821-3.
24. Cho JH, Nicolae DL, Gold LH, et al. Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:7502-7.
25. Hampe J, Schreiber S, Shaw SH, et al. A genomewide analysis provides evidence for novel linkages in inflammatory bowel disease in a large European cohort. *Am J Hum Genet* 1999;64:808-16.
26. Parkes M, Satsangi J, Lathrop GM, Bell JI, Jewell DP. Susceptibility loci in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1996;348:1588.
27. Satsangi J, Parkes M, Louis E, et al. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel

- disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet* 1996;14:199-202.
28. Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 2001;276:4812-8.
 29. Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2007;117:514-21.
 30. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol* 2004;5:800-8.
 31. Elson CO, Cong Y, McCracken VJ, Dimmitt RA, Lorenz RG, Weaver CT. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev* 2005;206:260-76.
 32. Girardin SE, Hugot JP, Sansonetti PJ. Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends Immunol* 2003;24:652-8.
 33. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003;278:8869-72.
 34. Stoll M, Corneliussen B, Costello CM, et al. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2004;36:476-80.
 35. Friedrichs F, Brescianini S, Annese V, et al. Evidence of transmission ratio distortion of DLG5 R30Q variant in general and implication of an association with Crohn disease in men. *Hum Genet* 2006;119:305-11.
 36. Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, et al. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* 2004;36:471-5.
 37. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006;314:1461-3.
 38. Torok HP, Glas J, Tonenchi L, Bruennler G, Folwaczny M, Folwaczny C. Crohn's disease is associated with a toll-like receptor-9 polymorphism. *Gastroenterology* 2004;127:365-6.
 39. Low JH, Williams FA, Yang X, et al. Inflammatory bowel disease is linked to 19p13 and associated with ICAM-1. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:173-81.
 40. Franchimont D, Vermeire S, El HH, et al. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 2004;53:987-92.
 41. Fernandez L, Martinez A, Mendoza JL, et al. Interleukin-10 polymorphisms in Spanish patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:739-43.
 42. Fernandez L, Nunez C, Mendoza JL, et al. A recombined haplotype in the major histocompatibility region contains a cluster of genes conferring high susceptibility to ulcerative colitis in the Spanish population. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:785-91.
 43. Fantini MC, Fina D, Pallone F. Inmunología de las enfermedades inflamatorias intestinales. MA Gassull, F. Gomollón, A. Obrador, J. Hinojosa, eds. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*, 3rd Edn Arán, 2007.
 44. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003;361:512-9.
 45. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005;307:1915-20.
 46. Fiocchi C. The normal intestinal mucosa: A state of controlled inflammation. *IBD, from bench to bedside*, 2nd Edn 2003.
 47. Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:1157-70.
 48. Cobrin GM, Abreu MT. Defects in mucosal immunity leading to Crohn's disease. *Immunol Rev* 2005;206:277-95.
 49. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007;448:427-34.
 50. Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1995;102:448-55.
 51. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003;3:521-33.
 52. O'Neil D, Steidler L. Cytokines, chemokines and growth factors in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel disease. *Adv Exp Med Biol* 2003;520:252-85.
 53. Torok HP, Glas J, Tonenchi L, Mussack T, Folwaczny C. Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis. *Clin Immunol* 2004;112:85-91.
 54. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75:263-74.

55. Veltkamp C, Tonkonogy SL, De Jong YP, et al. Continuous stimulation by normal luminal bacteria is essential for the development and perpetuation of colitis in Tg(epsilon26) mice. *Gastroenterology* 2001;120:900-13.
56. Guarner F. Bacterias Intestinales. Gassull MA, Gomollon F, Obrador A, Hinojosa J, eds. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*, 3rd Edn Arán, 2007.
57. Hattori M, Taylor TD. The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology. *DNA Res* 2009;16:1-12.
58. Duerkop BA, Vaishnava S, Hooper LV. Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. *Immunity* 2009;31:368-76.
59. Hooper LV. Do symbiotic bacteria subvert host immunity? *Nat Rev Microbiol* 2009;7:367-74.
60. Strober W. The multifaceted influence of the mucosal microflora on mucosal dendritic cell responses. *Immunity* 2009;31:377-88.
61. Bamias G, Nyce MR, De La Rue SA, Cominelli F. New concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Ann Intern Med* 2005;143:895-904.
62. Rutgeerts P, Van AG, Vermeire S, et al. Ornidazole for prophylaxis of postoperative Crohn's disease recurrence: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2005;128:856-61.
63. Rutgeerts P, Goboos K, Peeters M, et al. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. *Lancet* 1991;338:771-4.
64. Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2002;20:495-549.
65. Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, et al. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* 1998;66:5224-31.
66. Maeda Y, Noda S, Tanaka K, et al. The failure of oral tolerance induction is functionally coupled to the absence of T cells in Peyer's patches under germfree conditions. *Immunobiology* 2001;204:442-57.
67. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.
68. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005;17:1-14.
69. Belvin MP, Anderson KV. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12:393-416.
70. Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med* 2006;84:712-25.
71. Yamamoto-Furusho JK, Podolsky DK. Innate immunity in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007;13:5577-80.
72. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:588-93.
73. Kirschning CJ, Wesche H, Merrill AT, Rothe M. Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1998;188:2091-7.
74. Poltorak A, Smirnova I, He X, et al. Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol Dis* 1998;24:340-55.
75. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001;410:1099-103.
76. Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, et al. TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene* 1999;231:59-65.
77. Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur Cytokine Netw* 2000;11:362-71.
78. Chuang T, Ulevitch RJ. Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim Biophys Acta* 2001;1518:157-61.
79. Zhang D, Zhang G, Hayden MS, et al. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004;303:1522-6.
80. Salem ML, az-Montero CM, El-Naggar SA, Chen Y, Moussa O, Cole DJ. The TLR3 agonist poly(I:C) targets CD8+ T cells and augments their antigen-specific responses upon their adoptive transfer into naive recipient mice. *Vaccine* 2009;27:549-57.
81. Shi Z, Cai Z, Wen S, et al. Transcriptional Regulation of the Novel Toll-like Receptor Tlr13. *J Biol Chem* 2009;284:20540-7.
82. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004;118:229-41.
83. Takeda K. Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* 2005;11:51-5.
84. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002;20:709-60.

85. Sioud M, Haoudi A. RNA interference. *J Biomed Biotechnol* 2006;2006:89018.
86. Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 2000;68:7010-7.
87. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 2002;347:185-92.
88. Arnott ID, Nimmo ER, Drummond HE, et al. NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? *Genes Immun* 2004;5:417-25.
89. Pierik M, Joossens S, Van SK, et al. Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:1-8.
90. Oostenbrug LE, Drenth JP, de Jong DJ, et al. Association between Toll-like receptor 4 and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:567-75.
91. van Heel DA, Ghosh S, Hunt KA, et al. Synergy between TLR9 and NOD2 innate immune responses is lost in genetic Crohn's disease. *Gut* 2005;54:1553-7.
92. Abbas AK, Lichtman AH. Mecanismos efectores de la inmunidad celular. *Inmunología celular y molecular.*, 5th Edn Saunders, 2004.
93. Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389:737-42.
94. Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 1997;92:5S-11S.
95. Shih DQ, Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14:390-400.
96. Monteleone I, Vavassori P, Biancone L, Monteleone G, Pallone F. Immunoregulation in the gut: success and failures in human disease. *Gut* 2002;50 Suppl 3:III60-III64.
97. Allez M, Mayer L. Regulatory T cells: peace keepers in the gut. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:666-76.
98. Charles O, Elson, Casey T, Weaver. Experimental mouse models of inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis mechanisms. *Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Bedside.* 2nd Edn Kluwer Academic Publishers., 2003.
99. Strober W, Kelsall B, Fuss I, et al. Reciprocal IFN-gamma and TGF-beta responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunol Today* 1997;18:61-4.
100. Leach MW, Davidson NJ, Fort MM, Powrie F, Rennick DM. The role of IL-10 in inflammatory bowel disease: "of mice and men". *Toxicol Pathol* 1999;27:123-33.
101. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006;441:231-4.
102. Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, et al. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol* 1990;8:303-33.
103. Larche M. Anti-T-cell strategies in the treatment of allergic disease. *Allergy* 2002;57 Suppl 72:20-3.
104. Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, et al. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 1996;157:1261-70.
105. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* 2008;223:87-113.
106. Oboki K, Ohno T, Saito H, Nakae S. Th17 and allergy. *Allergol Int* 2008;57:121-34.
107. Sturm A, Fiocchi C. Life and death in the gut: more killing, less Crohn's. *Gut* 2002;50:148-9.
108. Ina K, Itoh J, Fukushima K, et al. Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *J Immunol* 1999;163:1081-90.
109. Di SA, Ciccocioppo R, Cinque B, et al. Defective mucosal T cell death is sustainably reverted by infliximab in a caspase dependent pathway in Crohn's disease. *Gut* 2004;53:70-7.
110. Roux ME, McWilliams M, Phillips-Quagliata JM, Lamm ME. Differentiation pathway of Peyer's patch precursors of IgA plasma cells in the secretory immune system. *Cell Immunol* 1981;61:141-53.
111. Kraehenbuhl JP, Neutra MR. Transepithelial transport and mucosal defence II: secretion of IgA. *Trends Cell Biol* 1992;2:170-4.
112. MacDermott RP, Nash GS, Bertovich MJ, et al. Altered patterns of secretion of monomeric IgA and IgA subclass 1 by intestinal mononuclear cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1986;91:379-85.
113. Scott MG, Nahm MH, Macke K, Nash GS, Bertovich MJ, MacDermott RP. Spontaneous secretion of IgG subclasses by intestinal mononuclear cells: differences between ulcerative colitis, Crohn's disease, and controls. *Clin Exp Immunol* 1986;66:209-15.

114. Roche JK, Fiocchi C, Youngman K. Sensitization to epithelial antigens in chronic mucosal inflammatory disease. Characterization of human intestinal mucosa-derived mononuclear cells reactive with purified epithelial cell-associated components in vitro. *J Clin Invest* 1985;75:522-30.
115. Das KM, Dasgupta A, Mandal A, Geng X. Autoimmunity to cytoskeletal protein tropomyosin. A clue to the pathogenetic mechanism for ulcerative colitis. *J Immunol* 1993;150:2487-93.
116. Saxon A, Shanahan F, Landers C, Ganz T, Targan S. A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol* 1990;86:202-10.
117. Sandborn WJ. Serologic markers in inflammatory bowel disease: state of the art. *Rev Gastroenterol Disord* 2004;4:167-74.
118. Fiocchi C. Una visión integrada de la fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal. MA Gassull, F.Gomollón, A.Obrador, J.Hinojosa, eds. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*, 3rd Edn Arán, 2007.
119. Youngman KR, Simon PL, West GA, et al. Localization of intestinal interleukin 1 activity and protein and gene expression to lamina propria cells. *Gastroenterology* 1993;104:749-58.
120. Mahida YR, Ceska M, Effenberger F, Kurlak L, Lindley I, Hawkey CJ. Enhanced synthesis of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in active ulcerative colitis. *Clin Sci (Lond)* 1992;82:273-5.
121. Braegger CP, Nicholls S, Murch SH, Stephens S, Macdonald TT. Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet* 1992;339:89-91.
122. Neurath MF, Becker C, Barbulescu K. Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut* 1998;43:856-60.
123. Kugathasan S, Willis J, Dahms BB, et al. Intrinsic hyperreactivity of mucosal T cells to interleukin-2 in pediatric Crohn's disease. *J Pediatr* 1998;133:675-81.
124. Fais S, Capobianchi MR, Pallone F, et al. Spontaneous release of interferon gamma by intestinal lamina propria lymphocytes in Crohn's disease. Kinetics of in vitro response to interferon gamma inducers. *Gut* 1991;32:403-7.
125. Monteleone G, Biancone L, Marasco R, et al. Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology* 1997;112:1169-78.
126. Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, et al. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol* 1999;162:6829-35.
127. Macdonald TT, Monteleone G, Pender SL. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 2000;51:2-9.
128. Hochberg MC, Lebowitz MG, Plevy SE, Hobbs KF, Yocum DE. The benefit/risk profile of TNF-blocking agents: findings of a consensus panel. *Semin Arthritis Rheum* 2005;34:819-36.
129. Hoentjen F, van Bodegraven AA. Safety of anti-tumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2009;15:2067-73.
130. Hommes DW, Mikhajlova TL, Stoinov S, et al. Fontolizumab, a humanised anti-interferon gamma antibody, demonstrates safety and clinical activity in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Gut* 2006;55:1131-7.
131. Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, et al. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 2004;351:2069-79.
132. Maloy KJ. The Interleukin-23 / Interleukin-17 axis in intestinal inflammation. *J Intern Med* 2008;263:584-90.
133. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 2007;204:1849-61.
134. Brown SJ, Mayer L. The immune response in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2007;102:2058-69.
135. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005;353:2462-76.
136. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, et al. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004;113:1490-7.
137. Fujino S, Andoh A, Bamba S, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003;52:65-70.
138. Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, McKenzie C, Steer HW, Macdonald TT. Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2001;108:601-9.
139. Kucharzik T, Stoll R, Luger N, Domschke W. Circulating antiinflammatory cytokine IL-10 in patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1995;100:452-6.
140. Melgar S, Yeung MM, Bas A, et al. Over-expression of interleukin 10 in mucosal T cells of patients with active ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2003;134:127-37.

141. Gasche C, Bakos S, Dejaco C, Tillinger W, Zakeri S, Reinisch W. IL-10 secretion and sensitivity in normal human intestine and inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol* 2000;20:362-70.
142. Rubin DT, Hanauer SB. Smoking and inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:855-62.
143. Bridger S, Lee JC, Bjarnason I, Jones JE, MacPherson AJ. In siblings with similar genetic susceptibility for inflammatory bowel disease, smokers tend to develop Crohn's disease and non-smokers develop ulcerative colitis. *Gut* 2002;51:21-5.
144. Regueiro M, Kip KE, Cheung O, Hegazi RA, Plevy S. Cigarette smoking and age at diagnosis of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:42-7.
145. Rhodes J, Thomas GA. Smoking: good or bad for inflammatory bowel disease? *Gastroenterology* 1994;106:807-10.
146. Galeazzi F, Blennerhassett PA, Qiu B, O'Byrne PM, Collins SM. Cigarette smoke aggravates experimental colitis in rats. *Gastroenterology* 1999;117:877-83.
147. Sher ME, Bank S, Greenberg R, et al. The influence of cigarette smoking on cytokine levels in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 1999;5:73-8.
148. Reif S, Klein I, Lubin F, Farbstein M, Hallak A, Gilat T. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 1997;40:754-60.
149. Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrick ET, Coggon D. Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet* 1994;343:766-7.
150. Corrao G, Tragnone A, Caprilli R, et al. Risk of inflammatory bowel disease attributable to smoking, oral contraception and breastfeeding in Italy: a nationwide case-control study. Cooperative Investigators of the Italian Group for the Study of the Colon and the Rectum (GISC). *Int J Epidemiol* 1998;27:397-404.
151. Forrest K, Symmons D, Foster P. Systematic review: is ingestion of paracetamol or non-steroidal anti-inflammatory drugs associated with exacerbations of inflammatory bowel disease? *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20:1035-43.
152. Levenstein S, Prantera C, Varvo V, et al. Stress and exacerbation in ulcerative colitis: a prospective study of patients enrolled in remission. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1213-20.
153. Melgar S, Engstrom K, Jagervall A, Martinez V. Psychological stress reactivates dextran sulfate sodium-induced chronic colitis in mice. *Stress* 2008;11:348-62.
154. Loftus EV, Jr. A practical perspective on ulcerative colitis: patients' needs from aminosalicilate therapies. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:1107-13.
155. Nikolaus S, Folsch U, Schreiber S. Immunopharmacology of 5-aminosalicylic acid and of glucocorticoids in the therapy of inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 2000;47:71-82.
156. Klotz U. The role of aminosalicilates at the beginning of the new millennium in the treatment of chronic inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Pharmacol* 2000;56:353-62.
157. Sutherland L, Roth D, Beck P, May G, Makiyama K. Oral 5-aminosalicylic acid for maintaining remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;CD000544.
158. Sutherland LR. Prevention of relapse of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2000;6:321-8.
159. Truelove SC, Witts L.J. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J* 1955;2:1041-8.
160. Hanauer SB, Sandborn W. Management of Crohn's disease in adults. *Am J Gastroenterol* 2001;96:635-43.
161. J.Hinojosa del Val. Farmacología de la enfermedad inflamatoria intestinal. MA Gassull, F. Gomollón, A. Obrador, J. Hinojosa, eds. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*, 3rd Edn Arán, 2007.
162. Zimmerman MJ, Jewell DP. Cytokines and mechanisms of action of glucocorticoids and aminosalicilates in the treatment of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1996;10 Suppl 2:93-8.
163. Kirman I, Whelan RL, Nielsen OH. Infliximab: mechanism of action beyond TNF-alpha neutralization in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:639-41.
164. Luger A, Lebedez P, Koch S, Kucharzik T. Apoptosis as a therapeutic tool in IBD? *Ann N Y Acad Sci* 2006;1072:62-77.
165. Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R, et al. Adalimumab induction therapy for Crohn disease previously treated with infliximab: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2007;146:829-38.
166. Sandborn WJ. Clinical perspectives in Crohn's disease. Moving forward with anti-TNF-alpha therapy: current needs and future treatments. *Rev Gastroenterol Disord* 2007;7 Suppl 2:S23-S35.
167. Kuhbacher T, Folsch UR. Practical guidelines for the treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007;13:1149-55.
168. Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL, Montori V. Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic

- review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *JAMA* 2006;295:2275-85.
169. ten HT, Van MC, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut* 2002;50:206-11.
 170. Martinez-Montiel MP, Munoz-Yague MT. Biologic therapies for chronic inflammatory bowel disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2006;98:265-91.
 171. Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, et al. Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol* 1999;163:143-7.
 172. Plevy S, Salzberg B, Van AG, et al. A phase I study of visilizumab, a humanized anti-CD3 monoclonal antibody, in severe steroid-refractory ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2007;133:1414-22.
 173. Ardizzone S, Bianchi PG. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. *J Intern Med* 2002;252:475-96.
 174. Bosani M, Ardizzone S, Porro GB. Biologic targeting in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Biologics* 2009;3:77-97.
 175. Ito H, Takazoe M, Fukuda Y, et al. A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;126:989-96.
 176. Sandborn WJ, Yednock TA. Novel approaches to treating inflammatory bowel disease: targeting alpha-4 integrin. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2372-82.
 177. Peyrin-Biroulet L, Desreumaux P, Sandborn WJ, Colombel JF. Crohn's disease: beyond antagonists of tumour necrosis factor. *Lancet* 2008;372:67-81.
 178. Schreiber S, Fedorak RN, Nielsen OH, et al. Safety and efficacy of recombinant human interleukin 10 in chronic active Crohn's disease. Crohn's Disease IL-10 Cooperative Study Group. *Gastroenterology* 2000;119:1461-72.
 179. Fedorak RN, Gangl A, Elson CO, et al. Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease. The Interleukin 10 Inflammatory Bowel Disease Cooperative Study Group. *Gastroenterology* 2000;119:1473-82.
 180. Sands BE, Winston BD, Salzberg B, et al. Randomized, controlled trial of recombinant human interleukin-11 in patients with active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:399-406.
 181. Moore KW, de Waal MR, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683-765.
 182. Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev* 2003;55:241-69.
 183. Lindsay JO, Hodgson HJ. Review article: the immunoregulatory cytokine interleukin-10- A therapy for Crohn's disease? *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:1709-16.
 184. Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, Squadrone S, de Waal MR, Roncarolo MG. IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol* 2001;166:5530-9.
 185. Oshima T, Laroux FS, Coe LL, et al. Interferon-gamma and interleukin-10 reciprocally regulate endothelial junction integrity and barrier function. *Microvasc Res* 2001;61:130-43.
 186. Abbas AK, Lichtman AH. *Citocinas. Inmunología celular y molecular*. 5th Edn, Saunders, 2004.
 187. Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 2005;5:271-83.
 188. O'Garra A, Vieira P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol* 2007;7:425-8.
 189. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 2008;180:5771-7.
 190. Bortesi L, Rossato M, Schuster F, et al. Viral and murine interleukin-10 are correctly processed and retain their biological activity when produced in tobacco. *BMC Biotechnol* 2009;9:22.
 191. Tagore A, Gonsalkorale WM, Pravica V, et al. Interleukin-10 (IL-10) genotypes in inflammatory bowel disease. *Tissue Antigens* 1999;54:386-90.
 192. Li MC, He SH. IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2004;10:620-5.
 193. Chernoff AE, Granowitz EV, Shapiro L, et al. A randomized, controlled trial of IL-10 in humans. Inhibition of inflammatory cytokine production and immune responses. *J Immunol* 1995;154:5492-9.
 194. Papadakis KA, Targan SR. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med* 2000;51:289-98.
 195. Barbara G, Xing Z, Hogaboam CM, Gaudie J, Collins SM. Interleukin 10 gene transfer prevents experimental colitis in rats. *Gut* 2000;46:344-9.
 196. Lindsay JO, Ciesielski CJ, Scheinin T, Hodgson HJ, Brennan FM. The prevention and treatment of murine colitis using gene therapy with adenoviral vectors encoding IL-10. *J Immunol* 2001;166:7625-33.
 197. Lindsay J, Van MC, Brennan F, et al. IL-10 gene therapy prevents TNBS-induced colitis. *Gene Ther* 2002;9:1715-21.

198. Papadakis KA, Targan SR. Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors. *Gastroenterology* 2000;119:1148-57.
199. van Deventer SJ. Immunomodulation of Crohn's disease using TNF-alpha neutralizing monoclonal antibodies. *Clin Nutr* 1997;16:271-5.
200. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:3666-70.
201. Clark IA. How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007;18:335-43.
202. Drutskaya MS, Efimov GA, Kruglov AA, Kuprash DV, Nedospasov SA. Tumor necrosis factor, lymphotoxin and cancer. *IUBMB Life* 2010;62:283-9.
203. Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:185-91.
204. Baert FJ, Rutgeerts PR. Anti-TNF strategies in Crohn's disease: mechanisms, clinical effects, indications. *Int J Colorectal Dis* 1999;14:47-51.
205. Bischoff SC, Lorentz A, Schwengberg S, Weier G, Raab R, Manns MP. Mast cells are an important cellular source of tumour necrosis factor alpha in human intestinal tissue. *Gut* 1999;44:643-52.
206. Suryaprasad AG, Prindiville T. The biology of TNF blockade. *Autoimmun Rev* 2003;2:346-57.
207. Rogler G, Andus T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 1998;22:382-9.
208. Sandborn WJ. Strategies for targeting tumour necrosis factor in IBD. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:105-17.
209. Murch SH, Lamkin VA, Savage MO, Walker-Smith JA, Macdonald TT. Serum concentrations of tumour necrosis factor alpha in childhood chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 1991;32:913-7.
210. Maeda M, Watanabe N, Neda H, et al. Serum tumor necrosis factor activity in inflammatory bowel disease. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1992;14:451-61.
211. Murch SH, Braegger CP, Walker-Smith JA, Macdonald TT. Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 1993;34:1705-9.
212. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 1992;10:411-52.
213. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3195-9.
214. Asarch A, Barak O, Loo DS, Gottlieb AB. Th17 cells: a new paradigm for cutaneous inflammation. *J Dermatolog Treat* 2008;19:259-66.
215. Wong M, Ziring D, Korin Y, et al. TNFalpha blockade in human diseases: mechanisms and future directions. *Clin Immunol* 2008;126:121-36.
216. Corredor J, Yan F, Shen CC, et al. Tumor necrosis factor regulates intestinal epithelial cell migration by receptor-dependent mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;284:C953-C961.
217. Stillie R, Stadnyk AW. Role of TNF receptors, TNFR1 and TNFR2, in dextran sodium sulfate-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1515-25.
218. Mizoguchi E, Mizoguchi A, Takedatsu H, et al. Role of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) in colonic epithelial hyperplasia and chronic intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology* 2002;122:134-44.
219. Holtmann MH, Douni E, Schutz M, et al. Tumor necrosis factor-receptor 2 is up-regulated on lamina propria T cells in Crohn's disease and promotes experimental colitis in vivo. *Eur J Immunol* 2002;32:3142-51.
220. Spoettl T, Hausmann M, Klebl F, et al. Serum soluble TNF receptor I and II levels correlate with disease activity in IBD patients. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:727-32.
221. Nakai M, Sudo K, Yamada Y, et al. The role of the tumor necrosis factor receptor in 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis in mice. *Dig Dis Sci* 2005;50:1669-76.
222. Mizoguchi E, Hachiya Y, Kawada M, et al. TNF receptor type I-dependent activation of innate responses to reduce intestinal damage-associated mortality. *Gastroenterology* 2008;134:470-80.
223. Kinoshita K, Hori M, Fujisawa M, et al. Role of TNF-alpha in muscularis inflammation and motility disorder in a TNBS-induced colitis model: clues from TNF-alpha-deficient mice. *Neurogastroenterol Motil* 2006;18:578-88.
224. Naito Y, Takagi T, Handa O, et al. Enhanced intestinal inflammation induced by dextran sulfate sodium in tumor necrosis factor-alpha deficient mice. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:560-9.
225. Kojouharoff G, Hans W, Obermeier F, et al. Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* 1997;107:353-8.
226. van Dullemen HM, van Deventer SJ, Hommes DW, et al. Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology* 1995;109:129-35.
227. Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, et al. A short-term study of chimeric monoclonal

- antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med* 1997;337:1029-35.
228. Eigler A, Sinha B, Hartmann G, Endres S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol Today* 1997;18:487-92.
 229. Lin J, Ziring D, Desai S, et al. TNFalpha blockade in human diseases: an overview of efficacy and safety. *Clin Immunol* 2008;126:13-30.
 230. Wirtz S, Neurath MF. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:1073-83.
 231. Kwon KH, Murakami A, Tanaka T, Ohigashi H. Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol* 2005;69:395-406.
 232. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989;96:795-803.
 233. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990;98:694-702.
 234. Boirivant M, Fuss IJ, Chu A, Strober W. Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J Exp Med* 1998;188:1929-39.
 235. Satoh H, Sato F, Takami K, Szabo S. New ulcerative colitis model induced by sulfhydryl blockers in rats and the effects of antiinflammatory drugs on the colitis. *Jpn J Pharmacol* 1997;73:299-309.
 236. Yamada T, Deitch E, Specian RD, Perry MA, Sartor RB, Grisham MB. Mechanisms of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin. *Inflammation* 1993;17:641-62.
 237. Sartor RB, Bond TM, Schwab JH. Systemic uptake and intestinal inflammatory effects of luminal bacterial cell wall polymers in rats with acute colonic injury. *Infect Immun* 1988;56:2101-8.
 238. MacPherson BR, Pfeiffer CJ. Experimental production of diffuse colitis in rats. *Digestion* 1978;17:135-50.
 239. Melgar S, Karlsson A, Michaelsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G1328-G1338.
 240. Melgar S, Drmotova M, Rehnstrom E, Jansson L, Michaelsson E. Local production of chemokines and prostaglandin E2 in the acute, chronic and recovery phase of murine experimental colitis. *Cytokine* 2006;35:275-83.
 241. Mähler M, Bristol IJ, Leiter EH, et al. Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1998;274:G544-G551.
 242. Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 1998;114:385-91.
 243. Kruidenier L, van Meeteren ME, Kuiper I, et al. Attenuated mild colonic inflammation and improved survival from severe DSS-colitis of transgenic Cu/Zn-SOD mice. *Free Radic Biol Med* 2003;34:753-65.
 244. Egger B, Bajaj-Elliott M, Macdonald TT, Inglin R, Eysselein VE, Buchler MW. Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency. *Digestion* 2000;62:240-8.
 245. Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights. *Exp Anim* 2000;49:9-15.
 246. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993;69:238-49.
 247. Vowinkel T, Kalogeris TJ, Mori M, Kriegelstein CF, Granger DN. Impact of dextran sulfate sodium load on the severity of inflammation in experimental colitis. *Dig Dis Sci* 2004;49:556-64.
 248. Pizarro TT, Arseneau KO, Bamias G, Cominelli F. Mouse models for the study of Crohn's disease. *Trends Mol Med* 2003;9:218-22.
 249. Melgar S, Karlsson L, Rehnstrom E, et al. Validation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis using four therapeutic agents for human inflammatory bowel disease. *Int Immunopharmacol* 2008;8:836-44.
 250. Johansson ME, Gustafsson JK, Sjoberg KE, et al. Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model. *PLoS One* 2010;5:e12238.
 251. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995;109:1344-67.
 252. Alex P, Zachos NC, Nguyen T, et al. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:341-52.
 253. Sivakumar PV, Westrich GM, Kanaly S, et al. Interleukin 18 is a primary mediator of the inflammation associated with dextran sulphate sodium induced colitis: blocking interleukin 18 attenuates intestinal damage. *Gut* 2002;50:812-20.

254. Yan Y, Kolachala V, Dalmasso G, et al. Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS One* 2009;4:e6073.
255. Okayasu I, Yamada M, Mikami T, Yoshida T, Kanno J, Ohkusa T. Dysplasia and carcinoma development in a repeated dextran sulfate sodium-induced colitis model. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:1078-83.
256. Axelsson LG, Landstrom E, Goldschmidt TJ, Gronberg A, Bylund-Fellenius AC. Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: effects in CD4(+) -cell depleted, athymic and NK-cell depleted SCID mice. *Inflamm Res* 1996;45:181-91.
257. Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, Beagley KW, Bucy RP, Elson CO. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology* 1994;107:1643-52.
258. Williams KL, Fuller CR, Dieleman LA, et al. Enhanced survival and mucosal repair after dextran sodium sulfate-induced colitis in transgenic mice that overexpress growth hormone. *Gastroenterology* 2001;120:925-37.
259. Maynard CL, Weaver CT. Intestinal effector T cells in health and disease. *Immunity* 2009;31:389-400.
260. Takedatsu H, Michelsen KS, Wei B, et al. TL1A (TNFSF15) regulates the development of chronic colitis by modulating both T-helper 1 and T-helper 17 activation. *Gastroenterology* 2008;135:552-67.
261. Fukuda M, Kanauchi O, Araki Y, et al. Prebiotic treatment of experimental colitis with germinated barley foodstuff: a comparison with probiotic or antibiotic treatment. *Int J Mol Med* 2002;9:65-70.
262. Im E, Choi YJ, Pothoulakis C, Rhee SH. *Bacillus polyfermenticus* ameliorates colonic inflammation by promoting cytoprotective effects in colitic mice. *J Nutr* 2009;139:1848-54.
263. Osman N, Adawi D, Ahrne S, Jeppsson B, Molin G. Modulation of the effect of dextran sulfate sodium-induced acute colitis by the administration of different probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Dig Dis Sci* 2004;49:320-7.
264. Rath HC, Schultz M, Freitag R, et al. Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infect Immun* 2001;69:2277-85.
265. Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 1993;75:253-61.
266. Spencer SD, Di MF, Hooley J, et al. The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the IL-10 receptor 2. *J Exp Med* 1998;187:571-8.
267. Mombaerts P, Mizoguchi E, Grusby MJ, Glimcher LH, Bhan AK, Tonegawa S. Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell* 1993;75:274-82.
268. Kontoyiannis D, Boulougouris G, Manoloukos M, et al. Genetic dissection of the cellular pathways and signaling mechanisms in modeled tumor necrosis factor-induced Crohn's-like inflammatory bowel disease. *J Exp Med* 2002;196:1563-74.
269. Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, et al. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 1999;10:39-49.
270. Panwala CM, Jones JC, Viney JL. A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis. *J Immunol* 1998;161:5733-44.
271. Rudolph U, Finegold MJ, Rich SS, et al. Gi2 alpha protein deficiency: a model of inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol* 1995;15:1015-5S.
272. Nenci A, Becker C, Wullaert A, et al. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature* 2007;446:557-61.
273. Hammer RE, Maika SD, Richardson JA, Tang JP, Taurog JD. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* 1990;63:1099-112.
274. Wirtz S, Finotto S, Kanzler S, et al. Cutting edge: chronic intestinal inflammation in STAT-4 transgenic mice: characterization of disease and adoptive transfer by TNF- plus IFN-gamma-producing CD4+ T cells that respond to bacterial antigens. *J Immunol* 1999;162:1884-8.
275. Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, et al. Interleukin 7 transgenic mice develop chronic colitis with decreased interleukin 7 protein accumulation in the colonic mucosa. *J Exp Med* 1998;187:389-402.
276. Hermiston ML, Gordon JI. Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science* 1995;270:1203-7.
277. Fuchs U, mm-Welk C, Borkhardt A. Silencing of disease-related genes by small interfering RNAs. *Curr Mol Med* 2004;4:507-17.
278. Sundberg JP, Elson CO, Bedigian H, Birkenmeier EH. Spontaneous, heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice. *Gastroenterology* 1994;107:1726-35.
279. Rivera-Nieves J, Bamias G, Vidrich A, et al. Emergence of perianal fistulizing disease in the

- SAMP1/YitFc mouse, a spontaneous model of chronic ileitis. *Gastroenterology* 2003;124:972-82.
280. Leach MW, Bean AG, Mauze S, Coffman RL, Powrie F. Inflammatory bowel disease in C.B-17 scid mice reconstituted with the CD45RBhigh subset of CD4+ T cells. *Am J Pathol* 1996;148:1503-15.
 281. Steinhoff U, Brinkmann V, Klemm U, et al. Autoimmune intestinal pathology induced by hsp60-specific CD8 T cells. *Immunity* 1999;11:349-58.
 282. Benavides F, Guénet JL. Tipos de modelos experimentales en función de su condición genética. Estandarización. Universidad de Alcalá, SECAL, eds. *Ciencia y Tecnología del Animal de Laboratorio*. 2008.
 283. Roque S, Nobrega C, Appelberg R, Correia-Neves M. IL-10 underlies distinct susceptibility of BALB/c and C57BL/6 mice to *Mycobacterium avium* infection and influences efficacy of antibiotic therapy. *J Immunol* 2007;178:8028-35.
 284. Montero JL, Tur Marí JA, Romero Vidal A. Modelos animales. Tipos y generalidades. Universidad de Alcalá, SECAL, eds. *Ciencia y Tecnología del Animal de Laboratorio* 2008.
 285. Prieto J, Herraiz M, Sangro B, et al. The promise of gene therapy in gastrointestinal and liver diseases. *Gut* 2003;52 Suppl 2:ii49-ii54.
 286. Clackson T. Regulated gene expression systems. *Gene Ther* 2000;7:120-5.
 287. Kitten O, Cosset FL, Ferry N. Highly efficient retrovirus-mediated gene transfer into rat hepatocytes in vivo. *Hum Gene Ther* 1997;8:1491-4.
 288. Jaffe HA, Danel C, Longenecker G, et al. Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat liver. *Nat Genet* 1992;1:372-8.
 289. Li Q, Kay MA, Finegold M, Stratford-Perricaudet LD, Woo SL. Assessment of recombinant adenoviral vectors for hepatic gene therapy. *Hum Gene Ther* 1993;4:403-9.
 290. Ponnazhagan S, Mukherjee P, Yoder MC, et al. Adeno-associated virus 2-mediated gene transfer in vivo: organ-tropism and expression of transduced sequences in mice. *Gene* 1997;190:203-10.
 291. Wolfe D, Niranjan A, Trichel A, et al. Safety and biodistribution studies of an HSV multigene vector following intracranial delivery to non-human primates. *Gene Ther* 2004;11:1675-84.
 292. Schagen FH, Ossevoort M, Toes RE, Hoeben RC. Immune responses against adenoviral vectors and their transgene products: a review of strategies for evasion. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;50:51-70.
 293. Arnberg N. Adenovirus receptors: implications for tropism, treatment and targeting. *Rev Med Virol* 2009;19:165-78.
 294. St George JA. Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors. *Gene Ther* 2003;10:1135-41.
 295. Sakurai H, Sakurai F, Kawabata K, et al. Comparison of gene expression efficiency and innate immune response induced by Ad vector and lipoplex. *J Control Release* 2007;117:430-7.
 296. Cheng DY, Kolls JK, Lei D, Noel RA. In vivo and in vitro gene transfer and expression in rat intestinal epithelial cells by E1-deleted adenoviral vector. *Hum Gene Ther* 1997;8:755-64.
 297. Wirtz S, Neurath MF. Gene transfer approaches for the treatment of inflammatory bowel disease. *Gene Ther* 2003;10:854-60.
 298. Wirtz S, Neurath MF. Inflammatory bowel disorders: gene therapy solutions. *Curr Opin Mol Ther* 2003;5:495-502.
 299. Sharma A, Li X, Bangari DS, Mittal SK. Adenovirus receptors and their implications in gene delivery. *Virus Res* 2009;143:184-94.
 300. Schaack J. Induction and inhibition of innate inflammatory responses by adenovirus early region proteins. *Viral Immunol* 2005;18:79-88.
 301. Leopold PL, Crystal RG. Intracellular trafficking of adenovirus: many means to many ends. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:810-21.
 302. Tomko RP, Xu R, Philipson L. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3352-6.
 303. Tomko RP, Johansson CB, Totrov M, Abagyan R, Frisen J, Philipson L. Expression of the adenovirus receptor and its interaction with the fiber knob. *Exp Cell Res* 2000;255:47-55.
 304. Croyle MA, Stone M, Amidon GL, Roessler BJ. In vitro and in vivo assessment of adenovirus 41 as a vector for gene delivery to the intestine. *Gene Ther* 1998;5:645-54.
 305. Walter E, Croyle MA, Roessler BJ, Amidon GL. The absence of accessible vitronectin receptors in differentiated tissue hinders adenoviral-mediated gene transfer to the intestinal epithelium in vitro. *Pharm Res* 1997;14:1216-22.
 306. Sakurai H, Kawabata K, Sakurai F, Nakagawa S, Mizuguchi H. Innate immune response induced by gene delivery vectors. *Int J Pharm* 2008;354:9-15.
 307. Koizumi N, Kawabata K, Sakurai F, Watanabe Y, Hayakawa T, Mizuguchi H. Modified adenoviral vectors ablated for coxsackievirus-adenovirus receptor, alphav integrin, and heparan sulfate

- binding reduce in vivo tissue transduction and toxicity. *Hum Gene Ther* 2006;17:264-79.
308. Hong SS, Karayan L, Tournier J, Curiel DT, Boulanger PA. Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *EMBO J* 1997;16:2294-306.
 309. Cotter MJ, Zaiss AK, Muruve DA. Neutrophils interact with adenovirus vectors via Fc receptors and complement receptor 1. *J Virol* 2005;79:14622-31.
 310. Kalyuzhnyi O, Di Paolo NC, Silvestry M, et al. Adenovirus serotype 5 hexon is critical for virus infection of hepatocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:5483-8.
 311. Nakamura T, Sato K, Hamada H. Reduction of natural adenovirus tropism to the liver by both ablation of fiber-coxsackievirus and adenovirus receptor interaction and use of replaceable short fiber. *J Virol* 2003;77:2512-21.
 312. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* 2003;80:148-58.
 313. Alba R, Bosch A, Chillon M. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther* 2005;12 Suppl 1:S18-S27.
 314. Mizuguchi H, Hayakawa T. Targeted adenovirus vectors. *Hum Gene Ther* 2004;15:1034-44.
 315. Engelhardt JF, Ye X, Doranz B, Wilson JM. Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:6196-200.
 316. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977;36:59-74.
 317. Morral N, O'Neal W, Rice K, et al. Administration of helper-dependent adenoviral vectors and sequential delivery of different vector serotype for long-term liver-directed gene transfer in baboons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12816-21.
 318. Chen HH, Mack LM, Kelly R, Ontell M, Kochanek S, Clemens PR. Persistence in muscle of an adenoviral vector that lacks all viral genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1645-50.
 319. Brunetti-Pierrri N, Ng P. Progress and prospects: gene therapy for genetic diseases with helper-dependent adenoviral vectors. *Gene Ther* 2008;15:553-60.
 320. Everett RS, Hodges BL, Ding EY, Xu F, Serra D, Amalfitano A. Liver toxicities typically induced by first-generation adenoviral vectors can be reduced by use of E1, E2b-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 2003;14:1715-26.
 321. Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gonczol E, Wilson JM. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4407-11.
 322. Yang Y, Li Q, Ertl HC, Wilson JM. Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *J Virol* 1995;69:2004-15.
 323. Worgall S, Wolff G, Falck-Pedersen E, Crystal RG. Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration. *Hum Gene Ther* 1997;8:37-44.
 324. Hartman ZC, Appledorn DM, Amalfitano A. Adenovirus vector induced innate immune responses: impact upon efficacy and toxicity in gene therapy and vaccine applications. *Virus Res* 2008;132:1-14.
 325. Liu Q, Muruve DA. Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors. *Gene Ther* 2003;10:935-40.
 326. Liu Q, Zaiss AK, Colarusso P, et al. The role of capsid-endothelial interactions in the innate immune response to adenovirus vectors. *Hum Gene Ther* 2003;14:627-43.
 327. Seregin SS, Appledorn DM, McBride AJ, et al. Transient pretreatment with glucocorticoid ablates innate toxicity of systemically delivered adenoviral vectors without reducing efficacy. *Mol Ther* 2009;17:685-96.
 328. Lozier JN, Csako G, Mondoro TH, et al. Toxicity of a first-generation adenoviral vector in rhesus macaques. *Hum Gene Ther* 2002;13:113-24.
 329. Flaherty DM, Hinde SL, Monick MM, et al. Adenovirus vectors activate survival pathways in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:L393-L401.
 330. Lieber A, He CY, Meuse L, et al. The role of Kupffer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after infusion of recombinant adenovirus vectors. *J Virol* 1997;71:8798-807.
 331. Kesisoglou F, Chamberlain JR, Schmiedlin-Ren P, et al. Chimeric Ad5 vectors expressing the short fiber of Ad41 show reduced affinity for human intestinal epithelium. *Mol Pharm* 2005;2:500-8.
 332. Bangari DS, Mittal SK. Development of nonhuman adenoviruses as vaccine vectors. *Vaccine* 2006;24:849-62.
 333. Vogels R, Zuijdgeest D, van RR, et al. Replication-deficient human adenovirus type 35 vectors for gene transfer and vaccination: efficient human cell infection and bypass of preexisting adenovirus immunity. *J Virol* 2003;77:8263-71.

334. Wickham TJ. Targeting adenovirus. *Gene Ther* 2000;7:110-4.
335. Balague C, Zhou J, Dai Y, et al. Sustained high-level expression of full-length human factor VIII and restoration of clotting activity in hemophilic mice using a minimal adenovirus vector. *Blood* 2000;95:820-8.
336. Maione D, Wiznerowicz M, Delmastro P, et al. Prolonged expression and effective readministration of erythropoietin delivered with a fully deleted adenoviral vector. *Hum Gene Ther* 2000;11:859-68.
337. Nelson JE, Kay MA. Persistence of recombinant adenovirus in vivo is not dependent on vector DNA replication. *J Virol* 1997;71:8902-7.
338. Wu GD, Chen L, Forslund K, Traber PG. Hepatocyte nuclear factor-1 alpha (HNF-1 alpha) and HNF-1 beta regulate transcription via two elements in an intestine-specific promoter. *J Biol Chem* 1994;269:17080-5.
339. El BS, Caliot E, Bens M, et al. Lymphoepithelial interactions trigger specific regulation of gene expression in the M cell-containing follicle-associated epithelium of Peyer's patches. *J Immunol* 2002;168:3713-20.
340. Yang TC, Millar JB, Grinshtein N, Bassett J, Finn J, Bramson JL. T-cell immunity generated by recombinant adenovirus vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2007;6:347-56.
341. Chirmule N, Truneh A, Haecker SE, et al. Repeated administration of adenoviral vectors in lungs of human CD4 transgenic mice treated with a nondepleting CD4 antibody. *J Immunol* 1999;163:448-55.
342. Stein CS, Pemberton JL, Van RN, Davidson BL. Effects of macrophage depletion and anti-CD40 ligand on transgene expression and redosing with recombinant adenovirus. *Gene Ther* 1998;5:431-9.
343. Kay MA, Holterman AX, Meuse L, et al. Long-term hepatic adenovirus-mediated gene expression in mice following CTLA4Ig administration. *Nat Genet* 1995;11:191-7.
344. Minter RM, Rectenwald JE, Fukuzuka K, et al. TNF-alpha receptor signaling and IL-10 gene therapy regulate the innate and humoral immune responses to recombinant adenovirus in the lung. *J Immunol* 2000;164:443-51.
345. Ilan Y, Prakash R, Davidson A, et al. Oral tolerization to adenoviral antigens permits long-term gene expression using recombinant adenoviral vectors. *J Clin Invest* 1997;99:1098-106.
346. Yin DX, Zhu L, Schimke RT. Tetracycline-controlled gene expression system achieves high-level and quantitative control of gene expression. *Anal Biochem* 1996;235:195-201.
347. Hickman MA, Malone RW, Lehmann-Bruinsma K, et al. Gene expression following direct injection of DNA into liver. *Hum Gene Ther* 1994;5:1477-83.
348. Jiang J, Yamato E, Miyazaki J. Intravenous delivery of naked plasmid DNA for in vivo cytokine expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;289:1088-92.
349. Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* 1999;6:1258-66.
350. Higuchi N, Maruyama H, Kuroda T, et al. Hydrodynamics-based delivery of the viral interleukin-10 gene suppresses experimental crescentic glomerulonephritis in Wistar-Kyoto rats. *Gene Ther* 2003;10:1297-310.
351. Liu F, Huang L. Development of non-viral vectors for systemic gene delivery. *J Control Release* 2002;78:259-66.
352. Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990;247:1465-8.
353. Zhang G, Budker V, Williams P, Subbotin V, Wolff JA. Efficient expression of naked dna delivered intraarterially to limb muscles of nonhuman primates. *Hum Gene Ther* 2001;12:427-38.
354. Meyer KB, Thompson MM, Levy MY, Barron LG, Szoka FC, Jr. Intratracheal gene delivery to the mouse airway: characterization of plasmid DNA expression and pharmacokinetics. *Gene Ther* 1995;2:450-60.
355. Li K, Welikson RE, Vikstrom KL, Leinwand LA. Direct gene transfer into the mouse heart. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:1499-504.
356. Choate KA, Khavari PA. Direct cutaneous gene delivery in a human genetic skin disease 9. *Hum Gene Ther* 1997;8:1659-65.
357. Budker V, Zhang G, Knechtle S, Wolff JA. Naked DNA delivered intraportally expresses efficiently in hepatocytes. *Gene Ther* 1996;3:593-8.
358. Zhang G, Vargo D, Budker V, Armstrong N, Knechtle S, Wolff JA. Expression of naked plasmid DNA injected into the afferent and efferent vessels of rodent and dog livers. *Hum Gene Ther* 1997;8:1763-72.
359. Zhang G, Budker V, Wolff JA. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 1999;10:1735-7.
360. Kawabata K, Takakura Y, Hashida M. The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. *Pharm Res* 1995;12:825-30.
361. Kobayashi N, Kuramoto T, Yamaoka K, Hashida M, Takakura Y. Hepatic uptake and gene expression

- mechanisms following intravenous administration of plasmid DNA by conventional and hydrodynamics-based procedures. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297:853-60.
362. Zhang G, Gao X, Song YK, et al. Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. *Gene Ther* 2004;11:675-82.
363. Zhang G, Song YK, Liu D. Long-term expression of human alpha1-antitrypsin gene in mouse liver achieved by intravenous administration of plasmid DNA using a hydrodynamics-based procedure. *Gene Ther* 2000;7:1344-9.
364. Hodges BL, Taylor KM, Joseph MF, Bourgeois SA, Scheule RK. Long-term transgene expression from plasmid DNA gene therapy vectors is negatively affected by CpG dinucleotides. *Mol Ther* 2004;10:269-78.
365. Yew NS, Przybylska M, Ziegler RJ, Liu D, Cheng SH. High and sustained transgene expression in vivo from plasmid vectors containing a hybrid ubiquitin promoter. *Mol Ther* 2001;4:75-82.
366. Yew NS, Zhao H, Przybylska M, et al. CpG-depleted plasmid DNA vectors with enhanced safety and long-term gene expression in vivo. *Mol Ther* 2002;5:731-8.
367. Budker V, Budker T, Zhang G, Subbotin V, Loomis A, Wolff JA. Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process. *J Gene Med* 2000;2:76-88.
368. Loser P, Jennings GS, Strauss M, Sandig V. Reactivation of the previously silenced cytomegalovirus major immediate-early promoter in the mouse liver: involvement of NFkappaB. *J Virol* 1998;72:180-90.
369. Hyde SC, Pringle IA, Abdullah S, et al. CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression. *Nat Biotechnol* 2008;26:549-51.
370. Yew NS, Zhao H, Wu IH, et al. Reduced inflammatory response to plasmid DNA vectors by elimination and inhibition of immunostimulatory CpG motifs. *Mol Ther* 2000;1:255-62.
371. Li S, Wu SP, Whitmore M, et al. Effect of immune response on gene transfer to the lung via systemic administration of cationic lipidic vectors. *Am J Physiol* 1999;276:L796-L804.
372. Barron LG, Uyechi LS, Szoka FC, Jr. Cationic lipids are essential for gene delivery mediated by intravenous administration of lipoplexes. *Gene Ther* 1999;6:1179-83.
373. Loisel S, Le GC, Doucet L, Ferec C, Floch V. Contribution of plasmid DNA to hepatotoxicity after systemic administration of lipoplexes. *Hum Gene Ther* 2001;12:685-96.
374. Liu F, Shollenberger LM, Huang L. Non-immunostimulatory nonviral vectors. *FASEB J* 2004;18:1779-81.
375. Prud'homme GJ. DNA vaccination against tumors. *J Gene Med* 2005;7:3-17.
376. Zhao H, Hemmi H, Akira S, Cheng SH, Scheule RK, Yew NS. Contribution of Toll-like receptor 9 signaling to the acute inflammatory response to nonviral vectors. *Mol Ther* 2004;9:241-8.
377. Tan Y, Li S, Pitt BR, Huang L. The inhibitory role of CpG immunostimulatory motifs in cationic lipid vector-mediated transgene expression in vivo. *Hum Gene Ther* 1999;10:2153-61.
378. Eastman SJ, Baskin KM, Hodges BL, et al. Development of catheter-based procedures for transducing the isolated rabbit liver with plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 2002;13:2065-77.
379. Sondergaard M, gnaes-Hansen F, Flyvbjerg A, Jensen TG. Normalization of growth in hypophysectomized mice using hydrodynamic transfer of the human growth hormone gene. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:E427-E432.
380. Yew NS, Wang KX, Przybylska M, et al. Contribution of plasmid DNA to inflammation in the lung after administration of cationic lipid:pDNA complexes. *Hum Gene Ther* 1999;10:223-34.
381. Macfarlane DE, Manzel L. Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J Immunol* 1998;160:1122-31.
382. Yi AK, Tuetken R, Redford T, Waldschmidt M, Kirsch J, Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. *J Immunol* 1998;160:4755-61.
383. Miller AM, Dean DA. Tissue-specific and transcription factor-mediated nuclear entry of DNA. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61:603-13.
384. Zamecnik PC, Stephenson ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:280-4.
385. Popescu FD. Antisense- and RNA interference-based therapeutic strategies in allergy. *J Cell Mol Med* 2005;9:840-53.
386. Zhang Y, Cristofaro P, Silbermann R, et al. Engineering mucosal RNA interference in vivo. *Mol Ther* 2006;14:336-42.
387. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-11.
388. Couzin J. Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash. *Science* 2002;298:2296-7.

389. Rayburn ER, Zhang R. Antisense, RNAi, and gene silencing strategies for therapy: mission possible or impossible? *Drug Discov Today* 2008;13:513-21.
390. van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 1990;2:291-9.
391. Robert E. Farrell Jr. PhD. RNA Interference: Targeted Gene Silencing. *RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization*. 3rd Edn 2005.
392. Wianny F, Zernicka-Goetz M. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol* 2000;2:70-5.
393. Svoboda P, Stein P, Hayashi H, Schultz RM. Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development* 2000;127:4147-56.
394. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411:494-8.
395. Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002;418:244-51.
396. Sioud M. RNA interference and innate immunity. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:153-63.
397. Watts JK, Deleavey GF, Damha MJ. Chemically modified siRNA: tools and applications. *Drug Discov Today* 2008;13:842-55.
398. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002;296:550-3.
399. Parrish S, Fleenor J, Xu S, Mello C, Fire A. Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Mol Cell* 2000;6:1077-87.
400. Boden D, Pusch O, Lee F, Tucker L, Ramratnam B. Efficient gene transfer of HIV-1-specific short hairpin RNA into human lymphocytic cells using recombinant adeno-associated virus vectors. *Mol Ther* 2004;9:396-402.
401. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001;15:188-200.
402. Kim DH, Behlke MA, Rose SD, Chang MS, Choi S, Rossi JJ. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol* 2005;23:222-6.
403. Behlke MA. Progress towards in vivo use of siRNAs. *Mol Ther* 2006;13:644-70.
404. Grimm D, Kay MA. RNAi and Gene Therapy: A Mutual Attraction. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007;2007:473-81.
405. Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002;297:2056-60.
406. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004;431:350-5.
407. Nakahara K, Carthew RW. Expanding roles for miRNAs and siRNAs in cell regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16:127-33.
408. Uprichard SL. The therapeutic potential of RNA interference. *FEBS Lett* 2005;579:5996-6007.
409. Ge Q, Filip L, Bai A, Nguyen T, Eisen HN, Chen J. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:8676-81.
410. Palliser D, Chowdhury D, Wang QY, et al. An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection. *Nature* 2006;439:89-94.
411. Grimm D, Kay MA. Therapeutic short hairpin RNA expression in the liver: viral targets and vectors. *Gene Ther* 2006;13:563-75.
412. Li M, Li H, Rossi JJ. RNAi in combination with a ribozyme and TAR decoy for treatment of HIV infection in hematopoietic cell gene therapy. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1082:172-9.
413. Gartel AL, Kandel ES. RNA interference in cancer. *Biomol Eng* 2006;23:17-34.
414. Pai SI, Lin YY, Macaes B, Meneshian A, Hung CF, Wu TC. Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Ther* 2006;13:464-77.
415. Raoul C, Barker SD, Aebischer P. Viral-based modelling and correction of neurodegenerative diseases by RNA interference. *Gene Ther* 2006;13:487-95.
416. Davidson BL, Boudreau RL. RNA interference: a tool for querying nervous system function and an emerging therapy. *Neuron* 2007;53:781-8.
417. Campochiaro PA. Potential applications for RNAi to probe pathogenesis and develop new treatments for ocular disorders. *Gene Ther* 2006;13:559-62.
418. Sioud M. Therapeutic siRNAs. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:22-8.
419. Kunath T, Gish G, Lickert H, Jones N, Pawson T, Rossant J. Transgenic RNA interference in ES cell-derived embryos recapitulates a genetic null phenotype. *Nat Biotechnol* 2003;21:559-61.
420. Dann CT, Alvarado AL, Hammer RE, Garbers DL. Heritable and stable gene knockdown in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:11246-51.
421. Golding MC, Long CR, Carmell MA, Hannon GJ, Westhusin ME. Suppression of prion protein in

- livestock by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:5285-90.
422. Lorenz C, Hadwiger P, John M, Vornlocher HP, Unverzagt C. Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells. *Bioorg Med Chem Lett* 2004;14:4975-7.
 423. Judge AD, Bola G, Lee AC, MacLachlan I. Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. *Mol Ther* 2006;13:494-505.
 424. Cekaite L, Furset G, Hovig E, Sioud M. Gene expression analysis in blood cells in response to unmodified and 2'-modified siRNAs reveals TLR-dependent and independent effects. *J Mol Biol* 2007;365:90-108.
 425. Shah S, Rangarajan S, Friedman SH. Light-activated RNA interference. *Angew Chem Int Ed Engl* 2005;44:1328-32.
 426. McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature* 2002;418:38-9.
 427. Lewis DL, Wolff JA. Delivery of siRNA and siRNA expression constructs to adult mammals by hydrodynamic intravascular injection. *Methods Enzymol* 2005;392:336-50.
 428. Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, et al. Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 2005;11:263-70.
 429. Judge AD, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintock K, MacLachlan I. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* 2005;23:457-62.
 430. Sioud M. Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization. *J Mol Biol* 2005;348:1079-90.
 431. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998;67:227-64.
 432. Robbins MA, Rossi JJ. Sensing the danger in RNA. *Nat Med* 2005;11:250-1.
 433. Karpala AJ, Doran TJ, Bean AG. Immune responses to dsRNA: implications for gene silencing technologies. *Immunol Cell Biol* 2005;83:211-6.
 434. Heil F, Hmad-Nejad P, Hemmi H, et al. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* 2003;33:2987-97.
 435. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 2004;5:730-7.
 436. Sioud M, Sorensen DR. Cationic liposome-mediated delivery of siRNAs in adult mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;312:1220-5.
 437. Ma Z, Li J, He F, Wilson A, Pitt B, Li S. Cationic lipids enhance siRNA-mediated interferon response in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;330:755-9.
 438. Robbins M, Judge A, MacLachlan I. siRNA and innate immunity. *Oligonucleotides* 2009;19:89-102.
 439. Song E, Zhu P, Lee SK, et al. Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol* 2005;23:709-17.
 440. Furset G, Floisand Y, Sioud M. Impaired expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase in monocyte-derived dendritic cells in response to Toll-like receptor-7/8 ligands. *Immunology* 2008;123:263-71.
 441. Krieg AM. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:471-84.
 442. Robbins M, Judge A, Liang L, McClintock K, Yaworski E, MacLachlan I. 2'-O-methyl-modified RNAs act as TLR7 antagonists. *Mol Ther* 2007;15:1663-9.
 443. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 2003;21:635-7.
 444. Bagga S, Bracht J, Hunter S, et al. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 2005;122:553-63.
 445. Chen PY, Weinmann L, Gaidatzis D, et al. Strand-specific 5'-O-methylation of siRNA duplexes controls guide strand selection and targeting specificity. *RNA* 2008;14:263-74.
 446. Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* 2003;17:438-42.
 447. Fedorov Y, Anderson EM, Birmingham A, et al. Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *RNA* 2006;12:1188-96.



Hipótesis y Objetivos

Hipótesis y Objetivos

El tratamiento actual de la IBD se ve seriamente limitado por diversos motivos, y pese al amplio abanico de terapias existentes, aún no se dispone de un fármaco que resulte idóneo para esta patología y que tenga un índice terapéutico elevado; es decir, que sea eficaz sin dar lugar a efectos adversos graves.

Habida cuenta de que en la IBD se dan una serie de alteraciones en la inmunidad innata y adaptativa, el uso de agentes inmunosupresores o inmunomoduladores es un recurso ampliamente utilizado. Sin embargo, los inmunosupresores e inmunomoduladores clásicos así como los agentes biológicos introducidos más recientemente, tienen efectos inespecíficos y generalizados, y su uso prolongado conlleva importantes riesgos y limitaciones.

La terapia génica, a través de la sobreexpresión de mediadores con efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios como la IL-10, podría permitir, en principio, corregir las alteraciones de la inmunidad innata y adaptativa que se dan en el paciente con IBD. Por otra parte, reducir la producción de citocinas proinflamatorias como TNF α , IFN- γ o IL-12 podría también corregir dichas alteraciones. Con el empleo de vectores apropiados capaces de alcanzar los órganos afectados de forma específica podrían, en principio, soslayarse gran parte de los efectos indeseables derivados de las acciones terapéuticas generalizadas. En cualquier caso es imprescindible diseñar vectores apropiados y demostrar la eficacia de estas estrategias o moléculas terapéuticas en modelos animales.

Así bien, hemos intentado responder a una serie de **preguntas**:

- 1.- ¿Cuál es el valor terapéutico de la sobreexpresión de IL-10 mediante vectores de expresión génica?*
- 2.- ¿Hasta qué punto es factible plantear readministraciones de vectores virales de expresión de IL-10?*
- 3.- ¿Podemos llegar específicamente al intestino incorporando a un Ad5 elementos de Ad salvajes causantes de gastroenteritis?*
- 4.- ¿Qué valor terapéutico tiene sobre modelos de IBD la silenciación de TNF α mediante siRNA's administrados localmente en el colon?*

Nuestras **hipótesis** de partida pueden pues enunciarse como sigue:

- 1)** La sobreexpresión de IL-10 de forma sistémica inducida mediante la administración de vectores virales y no virales puede tener efectos terapéuticos en modelos murinos de inflamación intestinal.

2) Por su efecto inmunomodulador, la IL-10 producida como resultado de la administración de dichos vectores virales podría soslayar las respuestas inmunes del huésped hacia el propio vector y hacer posible su readministración en patologías crónicas como la IBD.

3) Mediante vectores quiméricos contruidos a partir del Ad5 y de elementos de un adenovirus con tropismo intestinal específico como el Ad40 (virus asociado a diarreas infantiles), puede llegar a conferirse tropismo intestinal a vectores con un genoma perfectamente conocido y apropiado para la terapia génica.

4) La silenciación post-transcripcional del factor de necrosis tumoral (TNF α) a nivel local (en colon) a través del mecanismo de interferencia de RNA (RNAi) y el empleo de siRNA's (*short interference RNA*) podría reducir localmente la inflamación y ejercer efectos beneficiosos en modelos animales de IBD.

Por consiguiente, nuestros **objetivos** fueron:

a) Evaluar el potencial terapéutico de la sobreexpresión de IL-10 inducida por la administración intravenosa de Ad5 (replicación-defectivos) y plásmidos libres de secuencias inmunoestimuladoras CpG, ambos portadores del gen de la IL-10 murina, en un modelo animal de IBD (colitis inducida por dextrasulfonato sódico en ratones).

b) Valorar los efectos de vectores adenovirales capaces o no de inducir sobreexpresión de IL-10, sobre la respuesta inmune celular y humoral en el huésped tras administraciones múltiples, para determinar hasta qué punto la respuesta inmune frente al vector puede limitar su aplicación terapéutica reiterada.

c) Valorar la bioseguridad y la biodistribución de diferentes vectores adenovirales quiméricos (Ad40S, Ad40SL, Ad40.5 y Ad5.40), cualitativa- y cuantitativamente, en animales sanos y colíticos por diferentes vías de administración (oral, intrarectal e intravenosa) y compararla con la del adenovirus clásico (Ad5).

d) Evaluar los efectos de la silenciación de TNF α a nivel local (en colon) tras la administración intrarectal de un siRNA específico en un modelo murino de colitis (colitis inducida por DSS).

¿Cuál es el valor terapéutico de la sobreexpresión de IL-10 mediante vectores de expresión génica?



Capítulo 1

*Therapeutic efficacy of systemic IL-10 in colitis:
Advantages of CpG-free plasmids versus viral vectors*

(Submitted manuscript to Journal of Gene Medicine)

THERAPEUTIC EFFICACY OF SYSTEMIC IL-10 IN COLITIS: ADVANTAGES OF CpG-FREE PLASMIDS VERSUS VIRAL VECTORS

ABSTRACT

BACKGROUND: The efficacy of systemic administration of interleukin-10 (IL-10) for the treatment of intestinal inflammation has been assayed both in animal models of colitis and in clinical trials involving IBD patients. In clinical studies the therapeutic efficacy of IL-10 has been found to be limited, and this has been attributed to its quick degradation after intravenous injection.

AIM: We intended to compare the efficacy of liver-secreted IL-10 in a model of IBD.

METHODS: Type 5 adenovirus (Ad5) and a CpG-free plasmid (PI), both carrying the murine IL-10 gene (mIL-10), were intravenously given before induction of DSS-colitis. Plasma Serum Amyloid A, myeloperoxidase activity, microscopic colonic injury and colon length were determined 7 and 15 days post-treatment.

RESULTS: Plasma IL-10 levels attained with PI/IL-10 were higher compared with those achieved with Ad5IL-10 at both time points. At 7 days, clinical amelioration was similar in both treatments, with significant improvement of all inflammation-related parameters. Whereas 70% of Ad5IL-10 treated mice died beyond 7 days post-treatment, only 22% lethality was found in the PI/IL-10 group and 45% in colitic controls. PI/IL-10 mice did not differ from healthy controls in any inflammatory parameter at 15 days post-treatment. These data demonstrate that systemic IL-10 overexpression provides substantial benefit for colitis treatment in this model.

CONCLUSIONS: We conclude that: **1)** systemic IL-10 overexpression resulting from liver transfection with PI/IL-10 is safe and efficacious in ameliorating 3% DSS colitis for the length of the study. **2)** Despite the fact that Ad5IL-10 results in improved short-term clinical signs of colitis, Ad5IL-10 liver transduction might not be an appropriate approach for colitis management, not due to a low efficacy but rather to a secondary inflammatory reaction to vector proteins in an inflammatory and immunosuppressed scenario.

INTRODUCTION

Inflammatory bowel disease (IBD) is an increasingly prevalent disorder for which a suitable treatment is still lacking [1, 2]. IBD is thought to be caused by a loss of tolerance to resident enteric bacteria in genetically prone individuals resulting in T cell activation, leukocyte infiltration, and production of chemokines, monokines and pro-inflammatory cytokines [3, 4]. In this scenario the most obvious approach of the -so called- biological therapies should be either to increase the expression of immunoregulatory genes, such as IL-10, or to block the effects of proinflammatory mediators, such as TNF α . Both approaches should help overcome the spreading, chronification and worsening of the inflammation. A number of anti-TNF α -based strategies are currently in use for IBD treatment [5, 6], but any of them is entirely devoid of adverse reactions, refractoriness and other long term effects [2].

The immunoregulatory cytokine IL-10 was also envisaged as a good candidate to treat IBD [7]. Its ability to decrease both macrophage and T cell activity, to inhibit antigen presentation and to promote the expression of tight junction proteins improving the barrier function of the intestinal epithelium provide a good basis for its putative therapeutic efficacy [8-10]. Intravenous administration of recombinant IL-10 was shown to improve colitis in several murine models. Gene therapy approaches addressed to ensure IL-10 overexpression seemed also a rational strategy and were indeed tested in murine models of IBD. Thus it was reported that Ad5IL-10 administration is effective against colitis induced either by DSS or by TNBS [11-15]. However, despite the promising results obtained for IL-10 in preclinical studies, the results obtained for recombinant human IL-10 (rhIL-10) infusion in clinical trials with IBD patients have not been satisfactory [7, 16]. Indeed, the use of daily intravenous administrations of rhIL-10 for one month in Crohn's disease patients with moderate disease activity index (DAI) have resulted in mild therapeutic benefit [7], whereas in patients with high DAI the effectiveness of intravenous rhIL-10 is even lower [16]. The disagreement between preclinical and clinical data concerning the efficacy of high levels of IL-10 remains thus to be addressed. It is crucial to provide a better understanding of the actual therapeutic efficacy of such molecule and to revisit the putative value of its overexpression as a gene therapy strategy. With the breakthrough of the hydrodynamic-based injection of naked DNA [17] and the improved design of CpG-free plasmids, a high and sustained reporter gene expression is achievable, so the use of this kind of vectors seems a valuable choice [18-22].

Therefore, the aim of this work has been to compare the efficacy of two gene therapy vectors of IL-10 overexpression in a murine model of IBD, to study the relationship between non-local IL-10 production and efficacy, and to progress in the understanding of the actual value of IL-10 as a therapeutic gene for IBD.

MATERIALS AND METHODS

Animals

C57BL/6 healthy female mice (13 weeks old, 18-20 g body weight) purchased from Charles River (Lyon, France), were kept under specific pathogen free conditions in a protected autonomous unit throughout the experimental period with free access to food (A04 chow, PanLab) and water, and with a light/dark cycle of 12 h/12 h, under standard conditions (22°C and 70-80% relative humidity). Mice were acclimatized for at least one week before entering the study.

All experiments were approved by the Ethical Committee and the Biosafety Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona.

Preparation of plasmids and adenoviral vectors

For generation of the CpG-free IL-10 plasmid (PI/IL-10), cDNA of the murine IL-10 was inserted inside the MCS (multiple cloning site) of a CpG-free plasmid (Invivogen, Inc.) under the control of a hEF1 promoter and a CMV enhancer. Murine IL-10 cDNA was obtained from RIKEN Open reading frame Gene-Bank (Japan). CpG-free *null* plasmid was purchased from Invivogen, Inc.

For generation of the adenoviral vector containing the IL-10 gene, the expression cassette containing the cDNA of the murine IL-10 under the control of a hEF1 promoter and a CMV enhancer was cut from the PI/IL-10. The construct was then transferred to a shuttle plasmid, linearized and cotransfected into electrocompetent *E. coli* BJ5183 cells (Stratagene, Cat# 200154) together with the plasmid containing the adenoviral backbone. After homologous recombination positive transformants were identified by restriction analysis and used for subsequent E1-deleted adenovirus production in HEK293 cells (American Type Culture Collection, ATCC # CRL-1573™).

These studies were performed within the framework of a collaborative project with Dr. M. Chillón (CBATEG, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain) and Dr. J.C. Perales (Dpto. Ciencias Fisiológicas II, Fac. Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain).

DSS-induced colitis and vector administration

To induce colitis, C57BL/6 mice received 3% (w/v) dextran sulphate sodium salt (DSS, MP Biomedicals; MW 36-50 kD) in their drinking water for five consecutive days. Fresh DSS solution was prepared on alternate days. With this DSS regime a mild-severe colitis is established with weight loss, rectal mucus, diarrhea, bloody feces and changes in animal's aspect and behavior. Animals were examined daily to evaluate water/DSS and food consumption. Eighteen hours before exposure to DSS, vectors or placebo (Ringer's lactate) were injected intravenously into the tail vein (hydrodynamic injection for plasmids). A total of 82 mice were used in this study. See **tables 1, 2 and figure A** for study design explanation.

In all animals receiving five days of 3% DSS, weight loss, stool consistency, fecal blood and animal aspect were determined each day to assign an individual and daily disease activity index (DAI) as described previously [23]. DAI was determined by combining scores of *a) weight loss* (0-4 points), *b) stool score* (0-4 points), *c) animals aspect* (0-3 points) and *d) blood in feces* (0-3 points). Total DAI score was the sum of these parameters, ranging from 0 (unaffected) to 14 (highly severe colitis). See **table 3** for a detailed explanation.

GROUP	TREATMENT	# OF ANIMALS	ROUTE OF ADM.	DILUTION / DOSE
Healthy Controls	Placebo (R-L)	12	<i>i.v.</i> (tail vein)	200 µL R-L
Colitic Controls	Placebo (R-L)	18	<i>i.v.</i> (tail vein)	200 µL R-L
Colitic + Ad5IL-10	Ad5IL-10	19	<i>i.v.</i> (tail vein)	5x10 ⁸ IU in 200 µL R-L
Colitic + PI/IL-10	PI/IL-10	18	<i>i.v.</i> (tail vein) Hydrodynamic, in 7 sec max.	4 µg DNA in 2 mL R-L
Adenovirus null	Ad null	9	<i>i.v.</i> (tail vein)	5x10 ⁸ IU in 200 µL R-L
Plasmid null	PI null	6	<i>i.v.</i> (tail vein) Hydrodynamic, in 7 sec max.	4 µg DNA in 2 mL R-L

TABLE 1: Groups and number of animals employed, treatment, route of administration and dose used in short- and mid-term follow-up.
R-L: Ringer's Lactate solution (as vehicle and placebo), IU: Infectious Units.

	#	DSS	ENDPOINT		MORTALITY % (N-n/N)		
			Days 0-5	Day 7	Day 15	Day 7	Day 15
Treatment groups							
<i>i.v. administration at -18 h</i>	Healthy controls + R-L <i>i.v.</i>	12	-	n= 6	n= 6	0 (0/6)	0 (0/6)
	Colitic controls + R-L <i>i.v.</i>	18	+	n= 9	n= 5	0 (0/9)	44.4 (4/9)
	Colitic + Ad5IL-10 <i>i.v.</i>	19	+	n= 8	n= 3	11.1 (1/9)	70 (7/10)
	Colitic + PI/IL-10 <i>i.v.</i>	18	+	n= 9	n= 7	0 (0/9)	22.2 (2/9)
	Adenovirus null + R-L <i>i.v.</i>	9	-	n= 9	-	0 (0/9)	-
	Plasmid null + R-L <i>i.v.</i>	6	-	n= 6	-	0 (0/6)	-

TABLE 2: Schedule of short- (7 days) and mid-term (15 days) follow-ups. Administration of treatments, days of exposure to DSS, endpoints and percent mortality are stated in the table.
In the equation: (#), total number of animals per treatment group; (N) indicates the number of animals employed for each group at every time point; (n) indicates the number of animals surviving at each endpoint.

BODY WEIGHT CHANGE	SCORE	STOOL SCORE	SCORE
<0% (gain)	0	Normal	0
0-5% (loss)	1	Pasty feces	1
5-10% (loss)	2	Semi liquid feces, perianal dirt	2
10-15% (loss)	3	Aqueous feces, dirty / wet tail	3
>15% (loss)	4	Very aqueous, dirty / wet tail and back	4
ANIMAL ASPECT	SCORE	BLOODY FECES	SCORE
Normal	0	Semi-quantitative evaluation depending on the quantity of blood observed.	0-3
Coarse hair	1		
Coarse hair and abnormal activity	2		
Obvious dehydration	3		
ENDPOINT CRITERIA	SCORE	A score of 3 in two out of the three parameters analyzed was taken as endpoint criteria.	
Body Weight (Morton & Griffiths)	0-3		
Aspect (Morton & Griffiths)	0-3		
Behaviour: very aggressive or comatose?	Yes = 3 No = 0		

TABLE 3: Parameters and scores related with the DAI and endpoint criteria calculation.
Morton DB and Griffiths PH, Vet Rec. 1985;116(16):431-436.

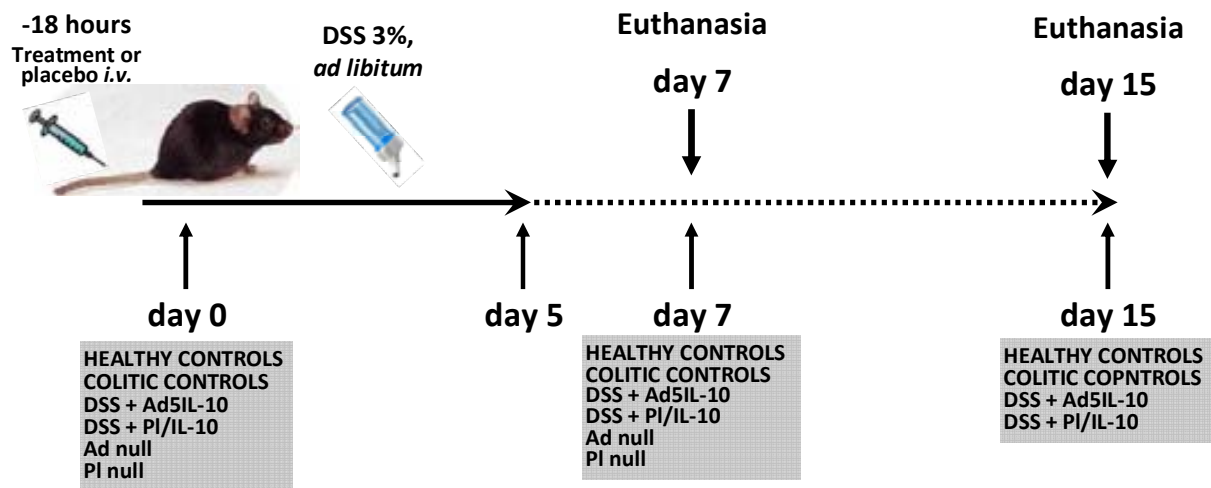


FIGURE A: Experimental design. Colitis was induced in C57BL/6 female mice by addition of 3% DSS in the tap water (*ad libitum*). Several IL-10 expressing or null vectors were intravenously injected 18 hours before induction of colitis.

Time course of DSS-induced colitis and Clinical Score

Preliminary studies were performed to evaluate the time course of disease. C57BL/6 mice (male and female) were euthanized on days 7 (*female mice*), 15 (*female*) and 27 (*male*) after starting the DSS regime described before.

In all animals receiving 5 days of 3% DSS, weight loss, stool consistency, fecal blood and animal aspect were determined each day to assign a daily individual disease activity index (DAI) as described previously [23]. See **table 3** for a detailed explanation.

Euthanasia and tissue collection

Mice were euthanized (on days 7 or 15 for IL-10 therapeutic studies) and plasma was obtained from whole blood collected by heart puncture performed under isoflurane (Isoba[®]vet, Shering-Plough) anesthesia. Intestines were carefully rinsed with saline. Spleen, liver, proximal and distal small intestine and colon were harvested and either fixed in 4% paraformaldehyde for histological analysis, or frozen in liquid nitrogen for myeloperoxidase activity assay (colon). Livers and spleens were weighed and colon length (from the colocecal junction to the rectum) measured as an index of colonic inflammation.

Histological analysis

Sections of 3 μ m of liver, spleen, small intestine and colon were obtained from paraffin-embedded tissues. Histological assessment and scoring was performed by an investigator blinded to the study design on hematoxylin and eosin (H&E) stained sections. Longitudinally cut colonic tissue was disposed as a Swiss-roll to allow inspection of the severity of inflammation along the entire colon. Four colon sections were examined per mouse and given an histological score as described [24]. Four independent parameters were measured: severity of inflammation (0-3: none, slight, moderate, severe), extent (0-3: none, mucosa, mucosa and submucosa, transmural), crypt damage (0-4: none, basal 1/3 damaged,

basal 2/3 damaged, only surface epithelium intact, entire crypt and epithelium lost) and regeneration (0-4: no tissue repair, surface epithelium not intact, regeneration with crypt depletion, almost complete regeneration, complete regeneration or normal tissue). The score of each parameter was multiplied by a factor reflecting the involvement (1-4: 1-25%, 26-50%, 51-75%, 76-100%) and the four resulting values were at least added. Thus, a total score for each mouse from 0 (no change in any segment) to 56 (maximal grade for all variables in all segments examined) was obtained. Scores <3 were considered to be normal basal inflammation. Liver, spleen and small intestine were also checked for the presence of any evidence of tissue damage.

Myeloperoxidase (MPO) activity

To estimate the extent of leukocyte infiltration, MPO activity in colon homogenates was measured adapting a previously described assay [25] for use in a 96-well plate.

After flushing the colons thoroughly to remove the luminal contents, they were cut, weighed and frozen at -80°C until use. Segments of 50-70 mg of tissue were homogenized in 0.5% hexadecyltrimethyl ammonium bromide (HTAB, H9151, Sigma) in 50 mM phosphate buffer, pH 6.0 (1 mL/50 mg tissue), with a conic glass homogenizer (Potter), and centrifuged (4°C, 3000 xg , 10 min). MPO was assayed in the clear supernatant by adding 1 mg/mL of *o*-dianisidine dihydrochloride (Sigma, D3252) and H₂O₂ 1 % (Sigma). The change in optical density was measured at 450 nm at 3-minute intervals (Plate reader TECAN Infinite F200). One MPO activity unit (U) was defined as the amount of enzyme that degraded 1 μ mol of peroxyde/min at 25°C. Results were expressed as U/mg wet tissue.

ELISA assays of murine IL-10 and murine Serum Amyloid A (SAA)

Enzyme-linked immunosorbent assay was performed for quantitative detection of murine IL-10 in plasma samples (Bender MedSystems, BMS61INST), following manufacturers' guidelines. For quantitative detection of murine SAA in plasma samples we used ELISA kits (Invitrogen, KMA0011C) following manufacturers' instructions. In both cases absorbances were read using 450 nm as the primary wave length in a plate spectrophotometer (Tecan Infinite F200). IL-10 and SAA concentrations were calculated after performing statistical regression with the corresponding standards.

Statistical analysis

All the data obtained were plotted and statistically analyzed using standard software (GraphPad Prism 4.0 for Windows). Comparison of mean values between different groups of animals was made using the Student t-Test (comparisons between two groups) and ANOVA and Bonferroni's multiple-comparison post-test (for more than two groups). Comparison of HS and DAI scores was made according to Kruskal-Wallis one-Way ANOVA followed by multiple-comparison Dunn's post-test. Box plots depict 5th, 25th, 50th (median), 75th and 95th percentiles. Linear regression analysis was performed to establish the correlation among the clinical parameters studied. Data are expressed as mean \pm SEM or median + percentiles for non-parametric DAI and HS values. P values < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Administration of 3% DSS in C57BL/6 mice induced a mild-moderate 'chronic' colitis

As seen in **figure 1**, animals lost body weight upon DSS consumption, particularly from days 4-5 (**fig. 1A**). Daily drinking volume did not differ significantly between the DSS-treated groups (data not shown). DAI values in colitic animals reached their maximum on days 6-7 and went back to nearly normal values at day 10 (**figs. 1B, 1C**). In contrast, mice receiving normal drinking water gained weight throughout the study. Female mice (*euthanized on days 7 and 15*) needed a shorter time (10-11 days) to regain normal body weight and DAI values whereas male mice (*euthanized on day 27*) needed 22 days.

Colon length was decreased in colitic animals compared to healthy mice at days 7 and 15 (post-induction of colitis). 27 days after induction of colitis this parameter returned to normal values (**fig. 1D**).

Conversely, MPO activity (**fig. 1E**) was higher in colitic animals at day 7 when compared to healthy controls, showing a high neutrophilic infiltration and an active inflammation at the endpoint (day 7). Animals euthanized at day 15 recovered nearly normal values regarding MPO activity. Mice euthanized at day 27 had normalized body weight, colon length and MPO activity (data not shown).

In accordance to our endpoint criteria, only one animal (male) had to be euthanized at day 11 post-induction of colitis.

Ad5 and plasmid carrying the IL-10 gene ameliorate DSS colitis

Short-term improvement of clinical signs of colitis: A single intravenous administration of either 5×10^8 Infectious Units (IU) of Ad5IL-10 or 4 μg of Pl/IL-10 was given 18 hours before induction of DSS colitis. This administration resulted in an attenuation of signs of colitis. To evaluate every possible variation during inflammation and treatment, body weight (**fig 2A**), and food and water consumption were measured daily for each animal throughout the experiment. Food intake was decreased during inflammation particularly from days 4-5 in all colitic groups (*not shown*).

A combined disease activity index, defined as described above (*see Materials and Methods*) was used to analyze the therapeutic benefit of both treatments. As seen in figures **2B** and **2C**, Ad5IL-10 and Pl/IL-10 colitic treated mice showed a lower DAI when compared to colitic untreated animals at day 7 (mean DAI values of Ad5IL-10 and Pl/IL-10 colitic treated mice were not significantly different from those of healthy animals).

Short-term amelioration of colon shortening: Animals fed with DSS exhibited significant colon shortening compared to healthy controls. This parameter is widely accepted as a reliable inflammation index [26, 27]. A significant attenuation of colon shortening was found in colitic mice treated with Ad5IL-10 and Pl/IL-10 when compared to

colitic untreated mice at day 7 (** $P < 0.001$ and * $P < 0.05$, respectively, vs. colitic untreated mice; **fig. 2D**).

MPO activity at day 7: Values of MPO activity (expressed as U/mg wet tissue) of healthy controls were near the baseline (**fig. 2E**). On the contrary, colitic controls showed high MPO values in agreement with the large number of neutrophils found in mucosa and submucosa. Colitic mice treated with either Ad5IL-10 or PI/IL-10 exhibited MPO values similar to those of healthy controls and non-colitic Ad5 *null*- and PI *null*-treated mice at 7 days.

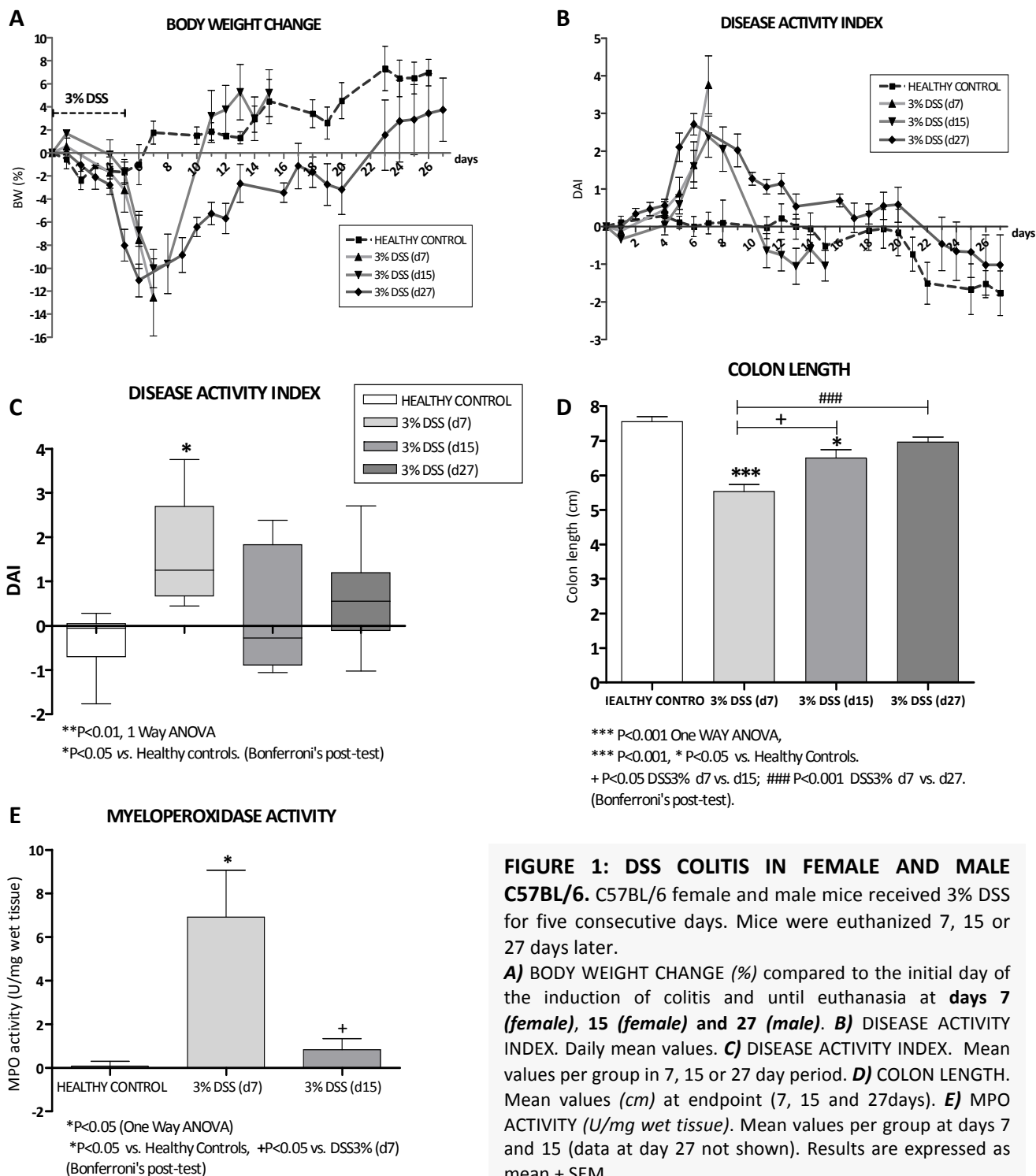


FIGURE 1: DSS COLITIS IN FEMALE AND MALE C57BL/6. C57BL/6 female and male mice received 3% DSS for five consecutive days. Mice were euthanized 7, 15 or 27 days later. **A)** BODY WEIGHT CHANGE (%) compared to the initial day of the induction of colitis and until euthanasia at **days 7 (female), 15 (female) and 27 (male)**. **B)** DISEASE ACTIVITY INDEX. Daily mean values. **C)** DISEASE ACTIVITY INDEX. Mean values per group in 7, 15 or 27 day period. **D)** COLON LENGTH. Mean values (cm) at endpoint (7, 15 and 27days). **E)** MPO ACTIVITY (U/mg wet tissue). Mean values per group at days 7 and 15 (data at day 27 not shown). Results are expressed as mean + SEM.

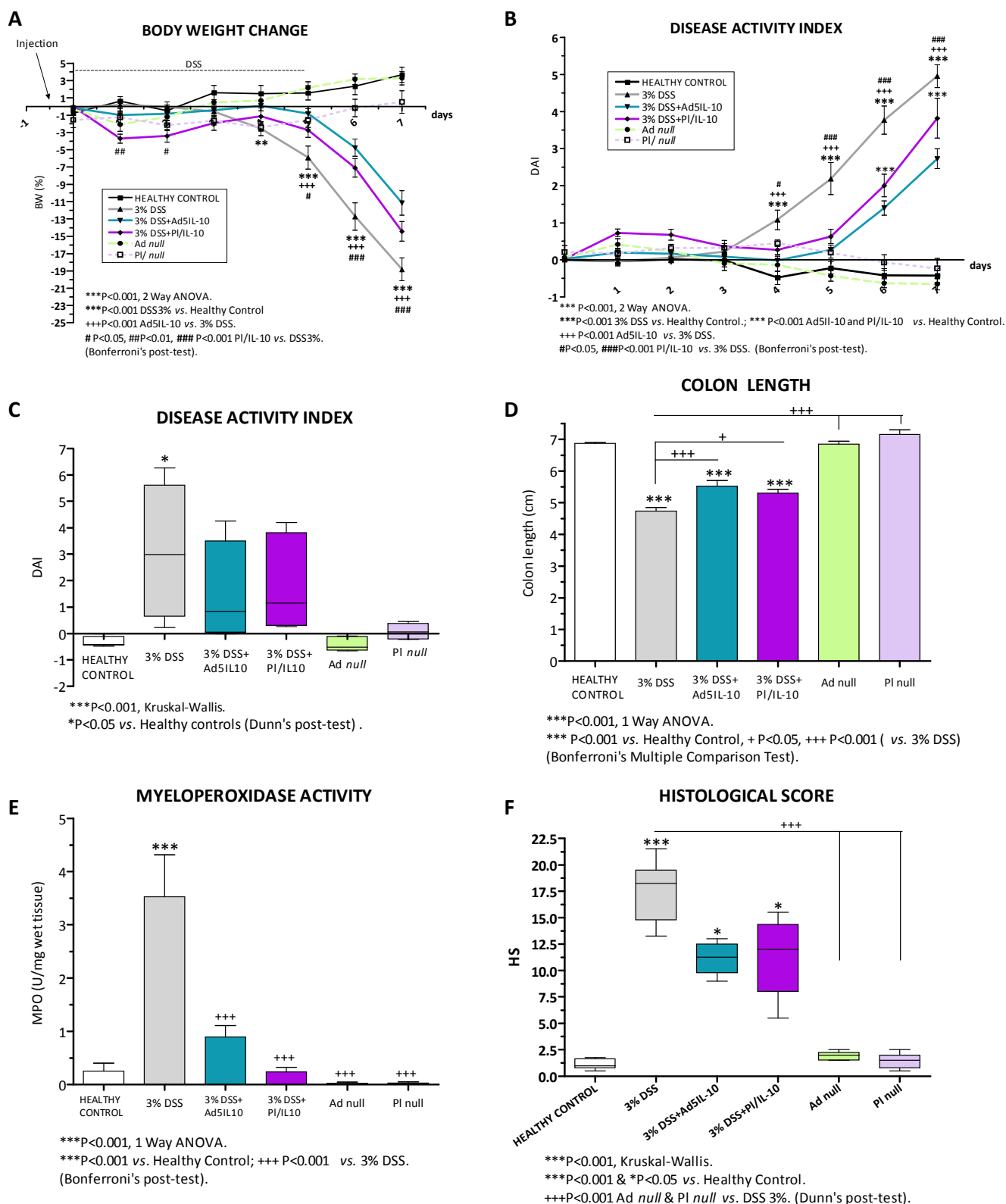


FIGURE 2: SHORT-TERM FOLLOW-UP STUDY. C57BL/6 female mice received an intravenous injection of either Ad5IL-10 or PI/IL-10 18 hours prior to the induction of 3% DSS colitis. Mice were euthanized 7 days later.

A) BODY WEIGHT CHANGE (%) compared with the initial day of the experiment and during the administration of 3% DSS (5 days) +/- Ad5IL-10 or PI/IL-10. **B)** DISEASE ACTIVITY INDEX. Daily mean values. **C)** DISEASE ACTIVITY INDEX. Mean values per group in 7 day period. **D)** COLON LENGTH. Mean values (cm) at endpoint (7days). **E)** MPO ACTIVITY (U/mg wet tissue). **F)** HISTOLOGICAL SCORE of C57BL/6 female mice at end-point (7 days). Four 200x magnification fields of longitudinally rolled colon sections were scored blinded to treatment groups. Results are expressed as mean + SEM or median + percentiles for DAI and HS.

Short-term improvement of histopathological scores: Median colonic microscopical damage score values [and Tukey's hinges] at day 7 were 1.00 for healthy controls, 18.25 [14.75 and 19.5] for 3% DSS mice (***) $P < 0.001$ vs. healthy controls), 11.25 [9.75 and 12.50] for DSS + Ad5IL-10 group, and 12.00 [8.00 and 14.38] for DSS + Pl/IL-10 group (* $P < 0.05$ vs. healthy controls). Score values for Ad *null* and Pl *null* animals were 2.00 [1.50 and 2.25] and 1.5 [0.75 and 2.00] respectively. These results are indicative of a beneficial effect for both treatments, since their scores were close to those of healthy controls (**fig. 2F**).

Figure 3 shows colon, liver and spleen H&E sections of all experimental groups (endpoint of 7 days). Colitic mice euthanized at day 7 showed severe and extensive damage predominantly in the colon but also in the caecum and distal ileum to a lesser extent (*not shown*). Inflammation was transmural, patchy and erosive, with chronic mononuclear infiltration of macrophages, lymphocytes and plasma cells, but also accumulating neutrophils indicating active acute disease. Crypt damage, abscesses and loss of the normal mucosal architecture were also evidenced. In contrast, microscopical damage found in Ad5IL-10 and Pl/IL-10 colitic treated mice was milder than that found in DSS controls in all these parameters (lower grade edema, scarce submucosal infiltration and mild crypt and epithelial loss). No pathological findings were observed in gastrointestinal tissues of Ad *null* and plasmid *null* treated controls (**fig. 3**).

Liver of colitic controls showed a diffusely eosinophilic pattern in most cases, and a tendency to lose the characteristic pallor of the healthy hepatocyte cytoplasm. Conversely, in mice treated with Pl/IL-10 liver appearance was similar to that of healthy animals, whereas in livers of Ad5IL-10-treated colitic as well as Ad *null* treated healthy mice (**fig. 3**) there was some evidence of an inflammatory infiltrate. The inflammatory infiltrate consisted of mononuclear cells distributed in small clusters in the perivascular region, the portal triad and also within the parenchyma.

Regarding spleen, the normal differentiation between white and red pulp found in healthy controls was lost in colitic mice, in which a lymphoid hyperplasia was often found. In sharp contrast, most colitic Ad5IL-10- and Pl/IL-10-treated mice showed a spleen morphology similar to that exhibited by healthy animals (**fig. 3**).

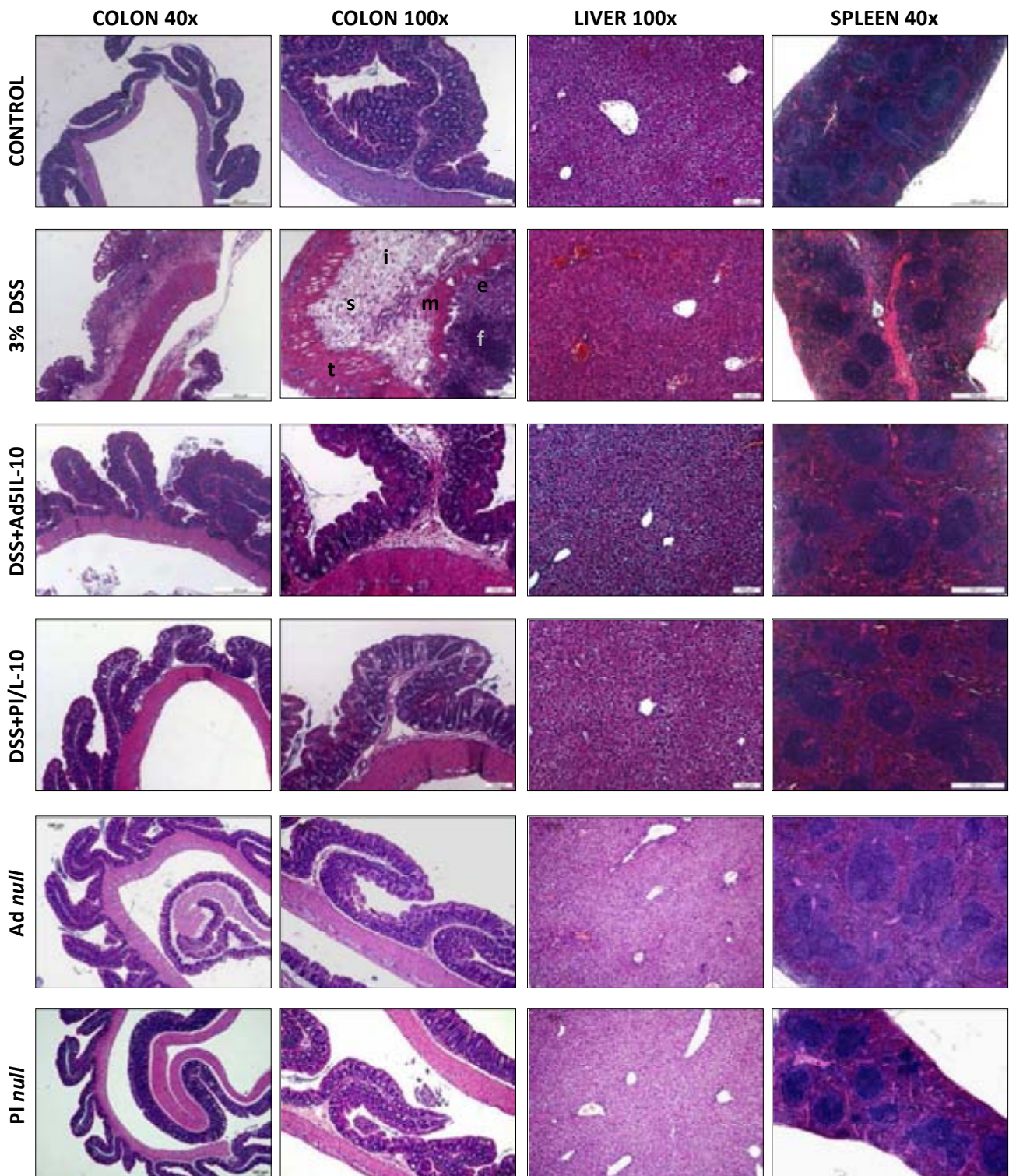


FIGURE 3: HISTOLOGIC ANALYSIS of C57BL/6 healthy control animals (CONTROL), colitic control (3% DSS), colitic treated with Ad5IL-10 (DSS+Ad5IL-10), colitic treated with PI/IL-10 (DSS+PI/IL-10), Ad *null* and plasmid *null* (PI *null*) treated mice.

H&E slides of colon (40x and 100x), liver (100x) and spleen (40x) of each group of animals at endpoint (7 days).

Structures: *e*, epithelial disruption; *f*, lymphoid follicle; *i*, inflammatory infiltrate; *m*, lamina muscularis mucosae; *s*, submucosal edema; *t*, muscularis thickening in lamina muscularis propria.

Mid-term amelioration of clinical signs of colitis: Figure 4 summarizes the findings corresponding to animals undergoing the same experimental procedures but euthanized on day 15. No statistically significant differences were found between both colitic treated groups when compared to colitic controls regarding mean DAI values (**fig. 4C**), colon length (**fig. 4D**) and MPO activity (**fig. 4E**). In contrast, daily body weight change and daily DAI values differed statistically between colitic untreated mice and colitic PI/IL-10 mice since day 6. Thirteen days after induction of colitis, DAI returned nearly to normal values and no differences were evidenced between colitic (treated and untreated) animals and healthy controls (**fig. 4B**).

As shown in **figures 4A and 4B** a 2 days delay in the instauration of colitis was found after either Ad5IL-10 or PI/IL-10 treatments when compared to colitic untreated mice. DAI values of untreated colitic animals began to increase at day 4 and peaked at day 9. Conversely, DAI values of colitic Ad5IL-10 and PI/IL-10 treated mice began to increase at day 6 and peaked at day 11 (for Ad5IL-10 mice) and at days 9-10 (for PI/IL-10 mice).

Within the Ad5IL-10 group a higher mortality rate was found (7/10 mice died between days 7-9, 70% mortality), whereas only 2/9 mice died in the colitic PI/IL-10-treated mice (22% mortality). Four out of 9 mice died between days 8 and 9 (45% mortality) in the colitic untreated control group (**fig. 4G**).

Mid-term amelioration of histopathological scores: A significant reduction in histological score median values [*and Tukey's hinges*] was found at day 15. Values were 2.00 [1.50 and 2.50] for healthy controls, 15.63 [12.00 and 20.75] for 3% DSS mice ($*** P < 0.001$ vs. healthy controls and $+ P < 0.05$ vs. DSS + PI/IL-10), 11.50 for DSS + Ad5IL-10 group ($*P < 0.05$ vs. healthy controls) and 7.00 [6.50 and 10.00] for DSS + PI/IL-10 group. These results demonstrate beneficial effects for both treatments (**fig. 4F**).

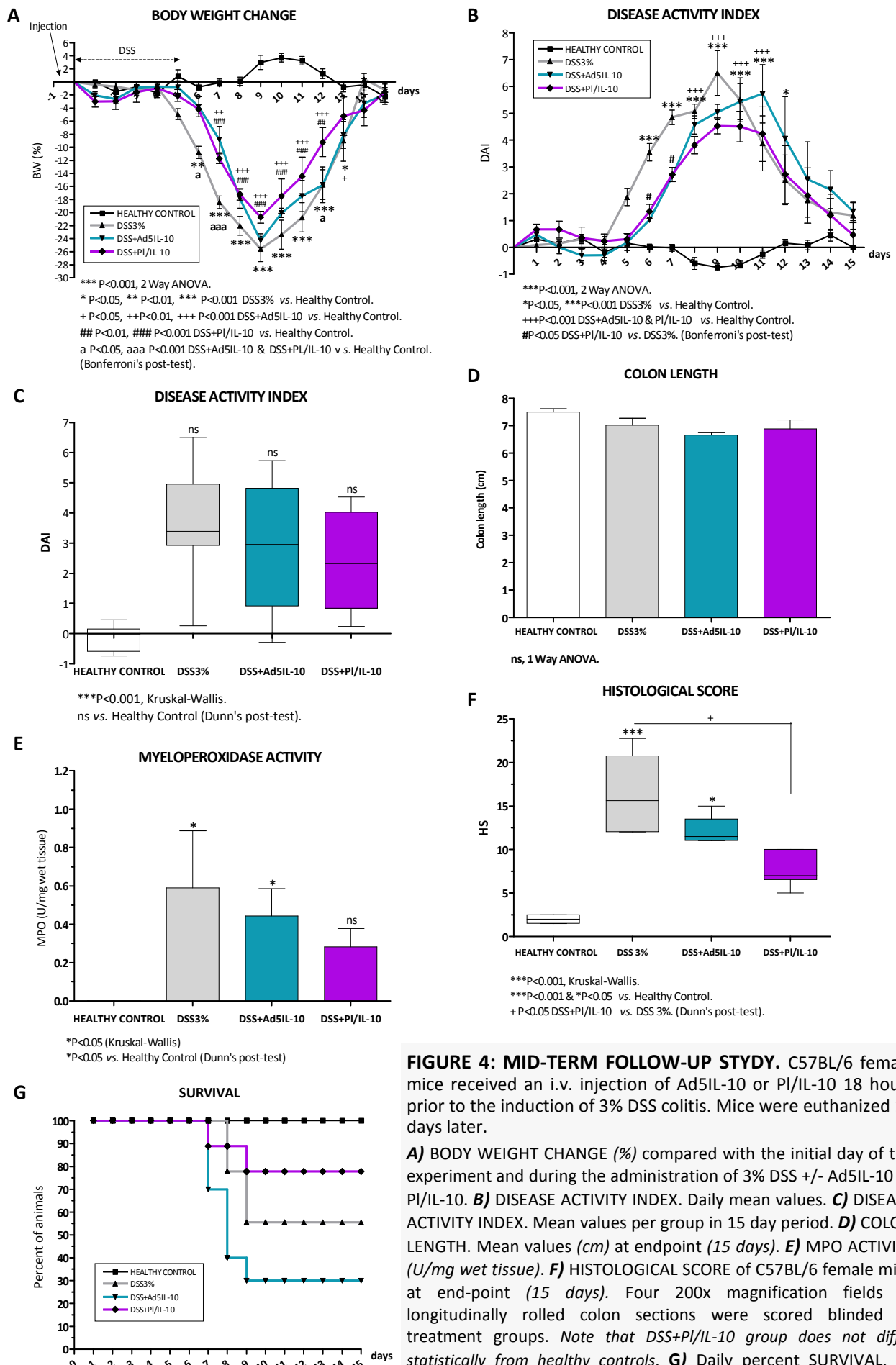


FIGURE 4: MID-TERM FOLLOW-UP STUDY. C57BL/6 female mice received an i.v. injection of Ad5IL-10 or PI/IL-10 18 hours prior to the induction of 3% DSS colitis. Mice were euthanized 15 days later.

A) BODY WEIGHT CHANGE (%) compared with the initial day of the experiment and during the administration of 3% DSS +/- Ad5IL-10 or PI/IL-10. **B)** DISEASE ACTIVITY INDEX. Daily mean values. **C)** DISEASE ACTIVITY INDEX. Mean values per group in 15 day period. **D)** COLON LENGTH. Mean values (cm) at endpoint (15 days). **E)** MPO ACTIVITY (U/mg wet tissue). **F)** HISTOLOGICAL SCORE of C57BL/6 female mice at end-point (15 days). Four 200x magnification fields of longitudinally rolled colon sections were scored blinded to treatment groups. Note that DSS+PI/IL-10 group does not differ statistically from healthy controls. **G)** Daily percent SURVIVAL. All results are expressed as mean + SEM or median + percentiles for DAI and HS.

Figure 5 shows representative liver sections of all experimental groups. A moderate inflammatory infiltrate could be seen in some areas in both Ad *null* and Ad5IL-10 treated mice as well as in colitic controls. As stated before, the inflammatory infiltrate consisted of mononuclear cells in small clusters around the perivascular region (V), the portal triad (PT) and also within the parenchyma (P); the liver exhibited a darker blue-violet colour in these groups of mice, losing the characteristic pallor encountered in healthy controls.

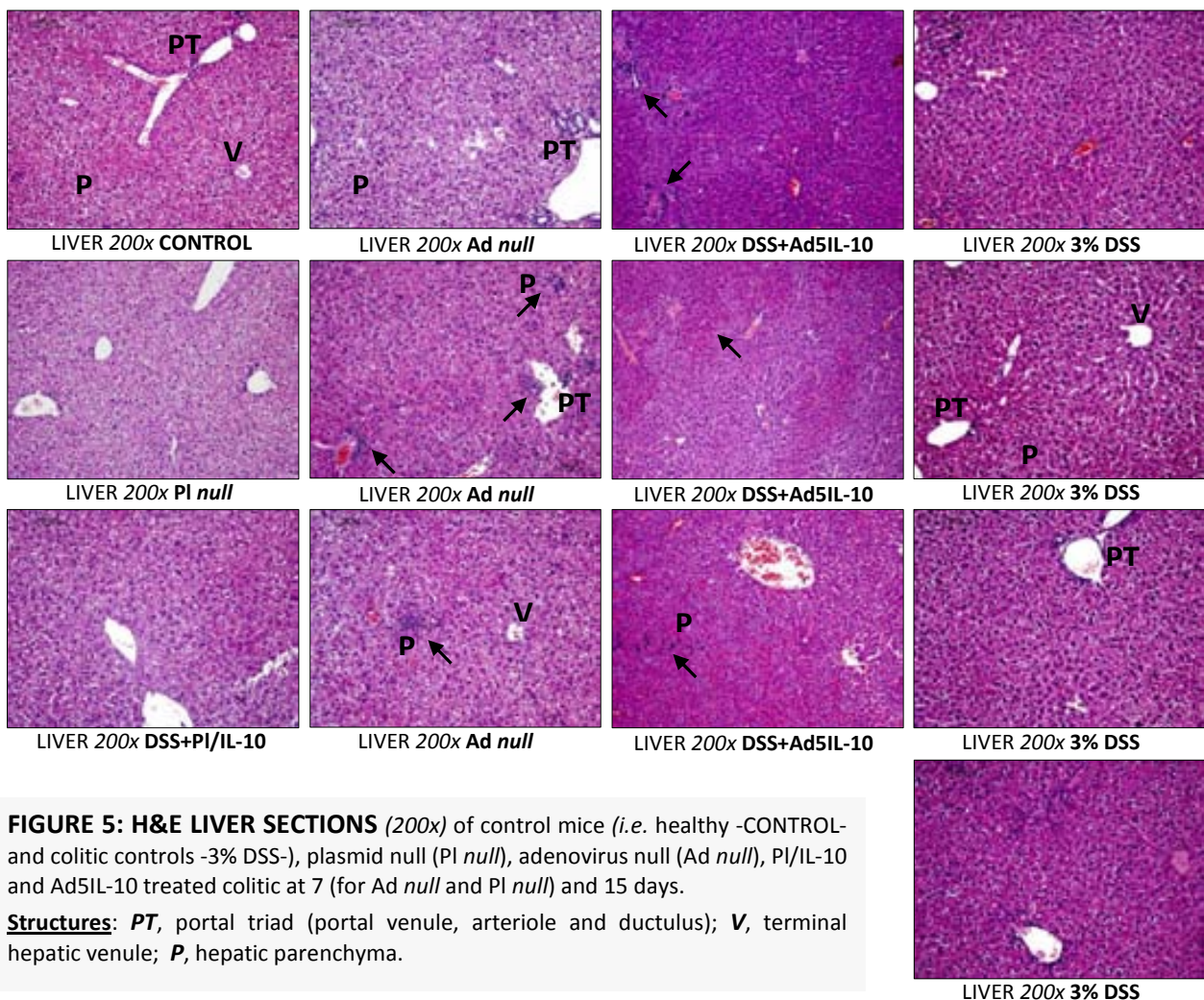


FIGURE 5: H&E LIVER SECTIONS (200x) of control mice (*i.e.* healthy -CONTROL- and colitic controls -3% DSS-), plasmid null (PI *null*), adenovirus null (Ad *null*), PI/IL-10 and Ad5IL-10 treated colitic at 7 (for Ad *null* and PI *null*) and 15 days.

Structures: PT, portal triad (portal venule, arteriole and ductulus); V, terminal hepatic venule; P, hepatic parenchyma.

Figure 6 shows H&E sections corresponding to colon, liver and spleen sections of all experimental groups of animals euthanized at day 15. Small intestine was intact in all groups (*not shown*). In sharp contrast, colon of untreated colitic mice evidenced mucosal inflammation with crypt distortion, epithelial loss, submucosal edema and inflammatory infiltrate. Features of colons of Ad5IL-10- and PI/IL-10-treated colitic mice were more similar to those of healthy mice than to colitic controls. Occasionally a mild edema and a slight inflammation were found.

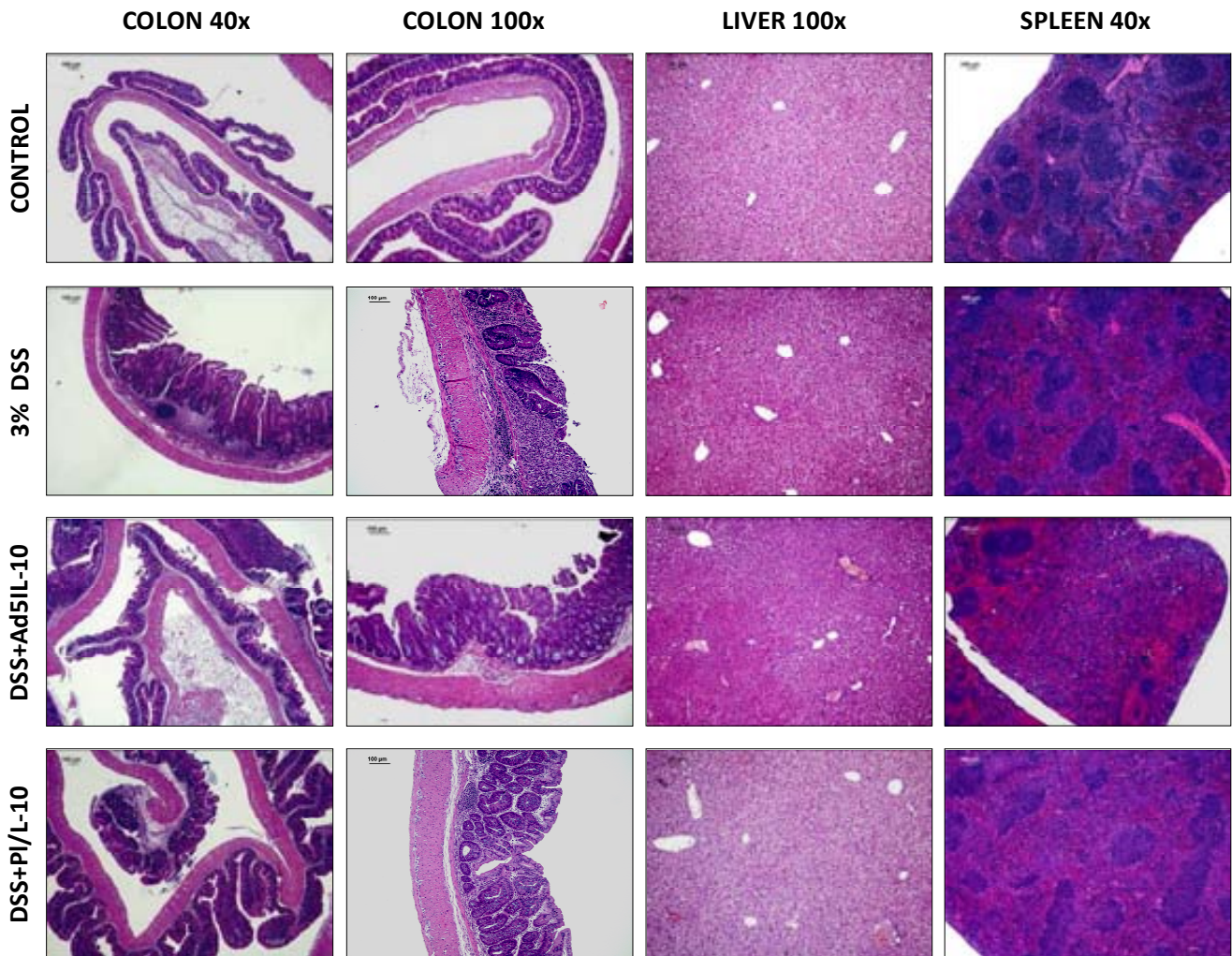


FIGURE 6: HISTOLOGIC ANALYSIS of C57BL/6 healthy control mice (CONTROL), colitic control (3% DSS), colitic treated with Ad5IL-10 (DSS+Ad5IL-10) and colitic treated with PI/IL-10 (DSS+PI/IL-10). H&E slides of colon (40x and 100x), liver (100x) and spleen (40x) of each group of animals at endpoint (15 days).

Plasma levels of murine IL-10 and SAA: Figures 7 and 8 and table 4 show murine IL-10 and SAA levels in plasma samples at end-points (7 and 15 days). The highest IL-10 levels were found in plasma of animals treated with PI/IL-10 at both endpoints (+ $P < 0.05$ vs. 3% DSS and DSS+Ad5IL-10 at day 7; + $P < 0.05$ vs. 3% DSS at day 15). A dramatic increase in SAA levels was found in colitic untreated animals at day 7 (***) $P < 0.001$ vs. healthy controls and DSS+PI/IL-10; ++ $P < 0.01$ vs. DSS+Ad5IL-10). Both Ad5IL-10 and PI/IL-10 treatments resulted in SAA values statistically lower than those of colitic untreated animals, in good agreement with the symptomatic improvement of both cases.

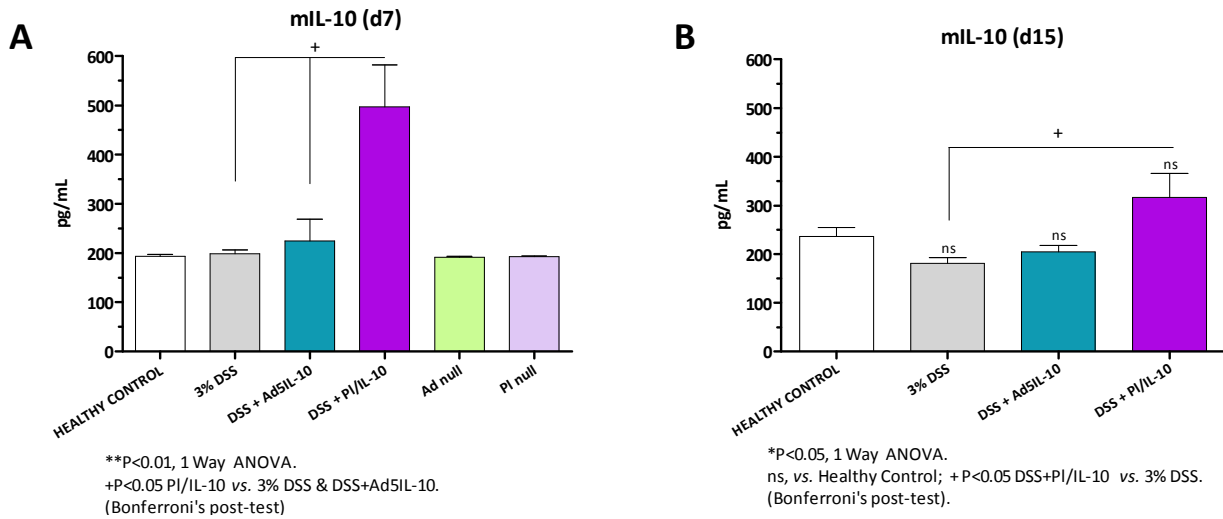


FIGURE 7: Plasma IL-10 levels (pg/mL) of mice euthanized at day 7 (A) and at day 15 (B).

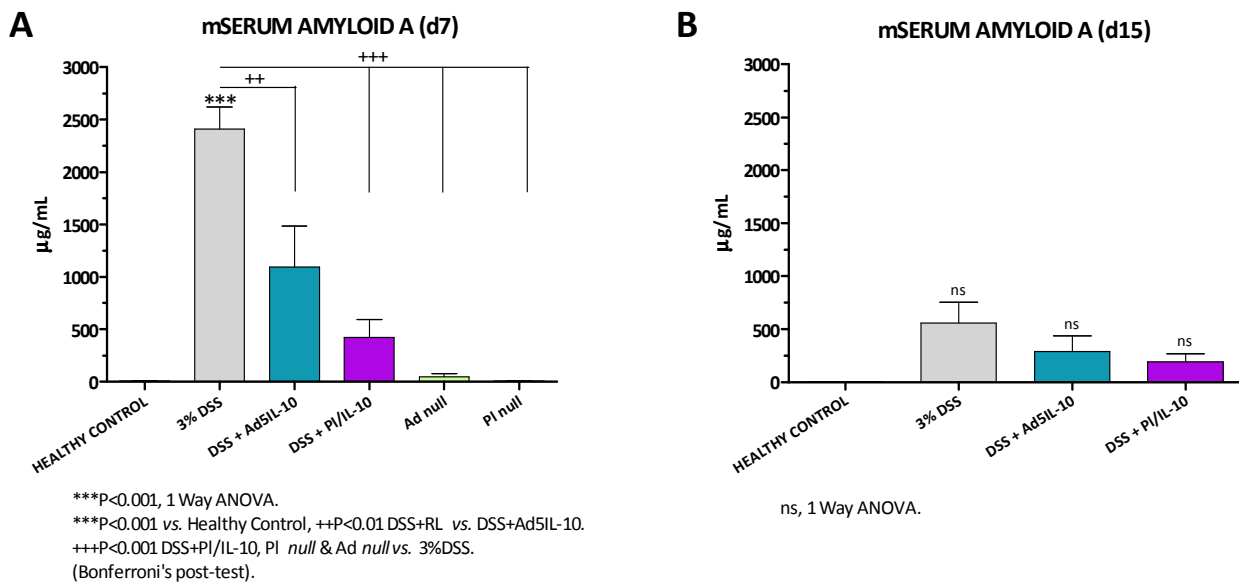


FIGURE 8: Plasma SAA levels (µg/mL) of mice euthanized at day 7 (A) and at day 15 (B).

	Healthy Control	3% DSS	DSS+Ad5IL-10	DSS+PI/IL-10	Ad null	PI null
Mean IL-10 (d7)	193.8	198.5	224.7	497.1	191.3	193
SEM	3.44	8.55	43.77	84.3	2.48	1.15
Mean IL-10 (d15)	236.1	181.5	205	316.3	-	-
SEM	18.94	11.31	13.3	49.7	-	-
Mean SAA (d7)	10.11	2407	1094	419.9	46.21	7.99
SEM	2.9	212.8	393.6	173.5	31.9	1.04
Mean SAA (d15)	6.28	557	288.5	192.2	-	-
SEM	0.04	197.8	148.5	77.5	-	-

TABLE 4:

Plasma mIL-10 and mSAA levels at endpoints (7 and 15 days). Results are expressed in pg/mL for IL-10 and µg/mL for SAA. Standard errors of the mean (SEM) are also shown.

Correlation analysis

Linear regression analysis was performed to study the correlation between different clinical parameters using individual data of mice of all experimental groups. **Figure 9** shows a positive correlation between colon length and HS ($p < 0.0001$, $r^2 = 0.7532$), systemic IL-10 levels and HS ($p = 0.0023$, $r^2 = 0.3786$), and MPO and HS ($p < 0.0001$, $r^2 = 0.4780$) at day 7; these positive correlations were also achieved at day 15 ($p = 0.0042$, $r^2 = 0.3045$; $p = 0.0016$, $r^2 = 0.5481$; $p < 0.0001$, $r^2 = 0.5859$, respectively).

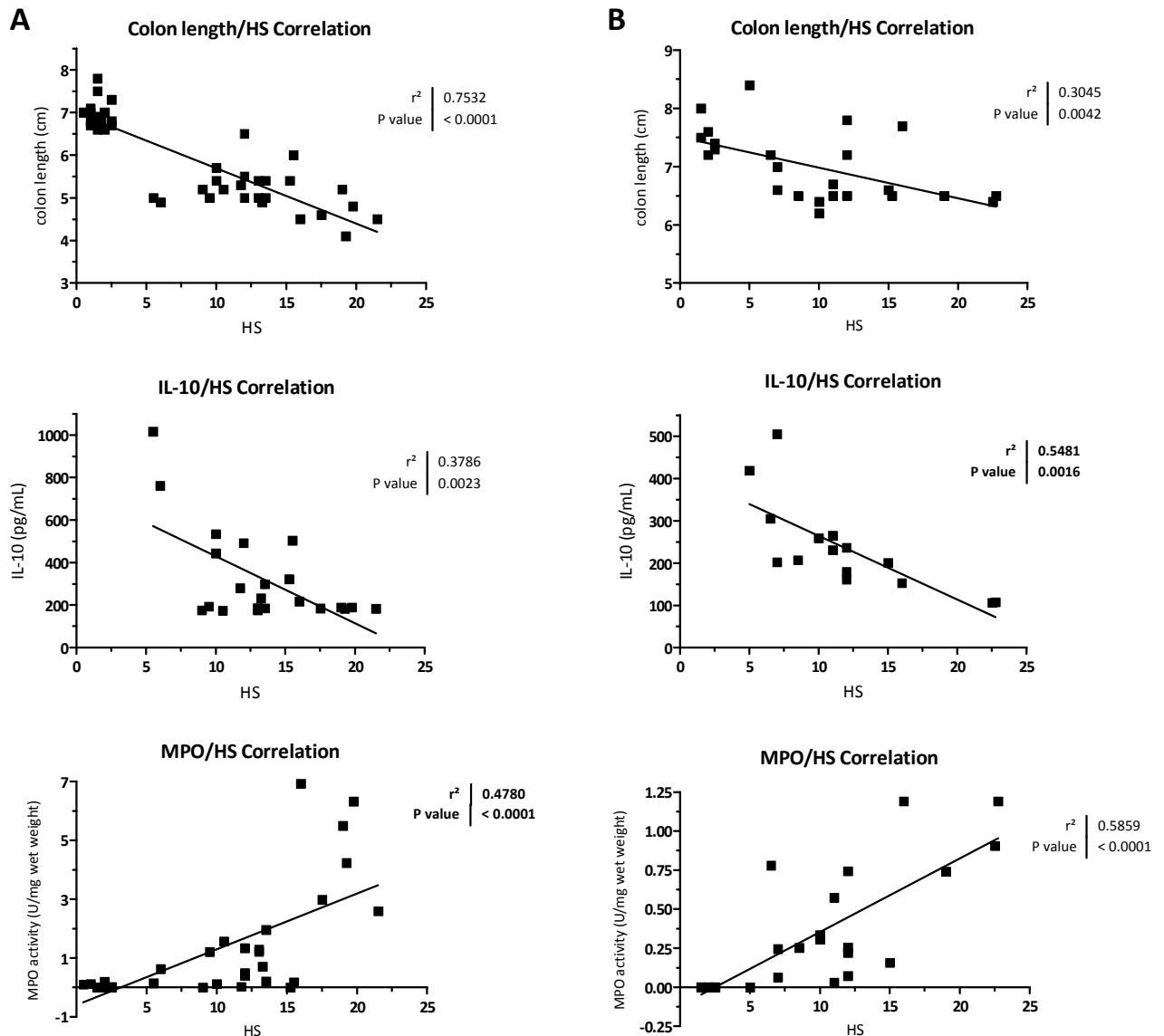


FIGURE 9: CORRELATION ANALYSIS. Linear regression analysis was performed to study the correlation between different clinical parameters using individual data of C57BL/6 mice of all experimental groups.

A) Correlations at day 7. **B)** Correlations at day 15.

GROUP		DAI	COLON LENGTH (cm)	SPLEEN WEIGHT (mg)	MPO (U/mg)	HS	IL-10 (pg/mL)	SAA (µg/mL)
EU day 7	Healthy	-0.200 ± 0.08	6.87 ± 0.05	65.00 ± 2.20	0.254 ± 0.14	1.15 ± 0.22	193.8 ± 3.44	10.11 ± 2.9
	3% DSS	2.060 ± 0.80	4.73 ± 0.11	61.67 ± 6.91	3.531 ± 0.78	17.47 ± 1.06	198.5 ± 8.55	2407 ± 212.8
	Ad5IL-10	1.014 ± 0.51	5.52 ± 0.17	76.33 ± 5.27	0.893 ± 0.22	11.13 ± 0.56	224.7 ± 43.77	1094 ± 393.6
	PI/IL-10	1.324 ± 0.50	5.30 ± 0.12	152.00 ± 1.60	0.239 ± 0.09	11.28 ± 1.20	497.1 ± 84.30	419.9 ± 173.5
	Ad null	-0.204 ± 0.13	6.84 ± 0.10	115.40 ± 4.52	0.025 ± 0.02	1.889 ± 0.14	191.3 ± 2.48	46.21 ± 31.9
	PI null	0.125 ± 0.08	7.15 ± 0.15	84.50 ± 2.53	0.031 ± 0.02	1.417 ± 0.27	193.0 ± 1.15	7.99 ± 1.04
EU day 15	Healthy	-0.056 ± 0.10	7.50 ± 0.11	65.0 ± 3.25	0.020 ± 0.01	2.00 ± 0.18	236.1 ± 18.94	6.3 ± 0.04
	3% DSS	2.189 ± 0.60	7.02 ± 0.26	143.2 ± 10.35	0.589 ± 0.30	16.44 ± 1.60	181.5 ± 11.31	557.0 ± 197.8
	Ad5IL-10	2.313 ± 0.56	6.66 ± 0.10	135.3 ± 15.03	0.442 ± 0.14	12.25 ± 0.94	205.0 ± 13.30	288.5 ± 148.5
	PI/IL-10	1.977 ± 0.42	6.88 ± 0.33	183.6 ± 13.82	0.283 ± 0.09	7.71 ± 0.70	316.3 ± 49.70	192.2 ± 77.50
TABLE 5:		Global results of short- and mid-term follow-up studies with Ad5IL-10 and PI/IL-10 in the DSS murine model of colitis. Results are expressed as mean ± SEM. EU, euthanasia.						

DISCUSSION

Most experimental studies dealing with the assessment of IL-10 efficacy using Ad vectors have shown great therapeutic benefits but only at early time points [12-15] and, in some instances, in IL-10 knocked-out mice [11]. In the present work we have explored the potential of a single systemic Ad5IL-10 or PI/IL-10 administration as putative therapies for intestinal inflammation employing the DSS model of colitis. In order to extend the length of systemic IL-10 expression, we have treated mice with a plasmid vector. The plasmid vector, devoid of CpG-islands, is given using the hydrodynamic injection technique. This results in an enhanced gene transfer and an extended length of expression of IL-10 in the liver which provides high and sustained plasma IL-10 levels. The efficacy of this gene therapy regime has been compared with that of Ad5IL-10 given intravenously in the murine DSS colitis model.

CpG-free constructs improve gene expression levels and durability, reducing hematological and liver toxicities [28-30]. Studies employing hydrodynamic administration of IL-10-expressing plasmids show a high efficiency of hepatic transfection [31, 32]. However, there is no literature on the use of plasmids as gene therapy vectors for intestinal inflammation. Our study in colitic C57BL/6 mice is thus the first to prove a therapeutic effect upon hydrodynamic injection of CpG-free PI/IL-10. Using this plasmid eighteen hours before addition of 3% DSS to drinking water, high levels of IL-10 could be detected in plasma, even 15 days after injection. In contrast, *Higuchi et al.* [31] gave a plasmid encoding viral IL-10 (hydrodynamic injection) in a rat model of glomerulonephritis but IL-10 plasma levels were lower (36 pg/mL 7 days after administration). Similarly, *Hong et al.* [32] obtained mean serum huIL-10 levels of 49.5 ± 47.6 pg/mL at day 7, and 0.7 ± 0.4 pg/mL at day 14 after hydrodynamic injection of huIL-10-pDNA to rats. In contrast, the plasmid used in the present work provided plasma IL-10 levels of 497 pg/mL at day 7, and 316 pg/mL at day 15. Since the doses of plasmid given in the present study are lower than those reported elsewhere, it seems likely that a significant improvement in the design of the plasmid and the use of a self gene of the host explain the discrepancy [33].

Previous studies [27, 34-37] have shown that the spleen weight increases as a consequence of the DSS colitis. In our study the spleen weight of colitic mice euthanized at day 15 was more than 2 times higher than that of colitic mice euthanized at day 7 (see table 5). Spleen weight was highest in PI/IL-10 colitic mice. This probably highlights the important immune response exerted in the spleen after the hydrodynamic injection of PI/IL-10 molecules, but without exerting deleterious effects.

Our results demonstrate that a single systemic injection of either IL-10 expression vectors is able to delay the onset of colitis and to improve clinical signs. During the first week both treatments were nearly equally effective in terms of attenuation of clinical signs and biochemical and histological parameters. Since no data have been published regarding

the effects of intravenously given recombinant IL-10 or Ad5mIL-10 treatments beyond the first week in this model, we extended our study to fulfill this gap and to progress in the understanding of the effects of IL-10 and of the vectors themselves in an inflammatory milieu. Fifteen days after PI/IL-10 administration to colitic mice MPO values and histological scores were still lower than those corresponding to colitic controls. Though, during the first week post-treatment the therapeutic efficacy found for the Ad5IL-10 was similar to that exhibited by the PI/IL-10, a high mortality rate was seen during the second week after Ad5IL-10 treatment. This fact was totally unexpected, since the therapeutic profile obtained with Ad5IL-10 and PI/IL-10 was similar and DSS was discontinued after day 5. All in all, these results are in marked contrast with improved survival rates observed in the PI/IL-10 group, even as compared to colitic controls.

Several reasons may account for this observed lethality in the Ad5IL-10 colitic group. *First*, a generalized immunosuppression caused by high IL-10 levels could favor the establishment of peritonitis and sepsis in the presence of bacterial translocation. In such case, one should expect the mortality to increase according to plasma IL-10 levels attained. As expected, both vectors are able to transfect the liver leading to IL-10 overproduction as demonstrated by the high systemic levels of this cytokine found even one week after a single injection of either vector. In the case of the PI/IL-10, IL-10 levels in plasma remain significantly increased about 2-fold the colitic control values even two weeks after a single injection. In this study IL-10 levels obtained after a single injection of PI/IL-10 were much higher than those obtained after Ad5IL-10 injection and peritonitis could not be unequivocally signaled as the cause of death. Thus, immunosuppression caused by IL-10 is not by itself primarily responsible for the differences observed treating the animals with both IL-10-expression vectors. *Alternatively*, systemic adenovirus injection might induce proinflammatory cytokine and chemokines. It has been reported that Ad5 intravenous injection results in a dose dependent release of IFN- γ , TNF α and IL-6 [13, 38, 39]. Also, the presence of hexon proteins -which are highly immunogenic- in the Ad5 capsid might promote an early innate and adaptive immune response. In fact, a mild leukocyte infiltration was found in the liver of Ad5 *null* and Ad5IL-10 treated mice, but not in PI *null* or PI/IL-10 treated animals. These results are in agreement with previous reports showing hepatic inflammatory infiltrates in animals administered with an Ad *null*, Ad5 β gal or Ad5IL-10 which usually peaked 7-10 days post-infection [40-43]. These authors demonstrate that the cellular infiltrates were located next to transgene-expressing cells and were shown to be mostly CD8⁺ cytotoxic T cells [40]. This fact may contribute to the complete elimination of the transgene-expressing cells 15 days post-infection and may also account for the direct toxicities observed in our study. *Finally*, it has also been demonstrated that E1-deleted Ad promote survival of transduced cells, by increasing antiapoptotic signals (ERK and PI3 kinases) in vitro [44]. This may contribute to the delayed toxicity observed in vivo which is

enhanced in an inflammatory background with a disrupted intestinal barrier and a reduced macrophage activity caused by DSS.

The powerful immunomodulatory properties of IL-10 and the promising results from IL-10 delivery in animal models and in some human inflammatory conditions raised very good prospects for its clinical application. In humans, the presence of high systemic levels of rhIL-10 for long periods of time was reported to be safe and well tolerated, though only very mild clinical benefit was evidenced in IBD [7, 16, 45]. However, *Tilg et al.* showed that higher doses of systemic rhIL-10 might be detrimental rather than beneficial in patients with active CD [46]. Thus, the action of IL-10 may differ depending on the local microenvironment, the disease stage, and its concentration [47]. All in all, the cost, the low local bioavailability, the heterogeneous interindividual responses, as well as the possible adverse effects after systemic treatment with this cytokine have hampered its clinical application. No data regarding immunosuppressive effects caused by sustained IL-10 levels in this animal model have been reported to date. In this regard, our results do not support the concept of deleterious consequences caused by high plasma levels of IL-10 at least in the context of CpG-free PI/IL-10 transfection and within the experimental period reported here.

To our knowledge this is the first study comparing two different gene therapy approaches in a model of murine colitis. In conclusion this study shows that: **1)** high and sustained levels of IL-10 expression can be achieved with an appropriate design of the expression plasmid and the transfection technique, and **2)** adenoviral vectors causing a high degree of hepatic transduction can promote important non-immediate toxic effects particularly on an inflammatory background. Thus, the potential of IL-10 as a therapeutic molecule needs to be reevaluated in the light of the results reported here.

REFERENCES

1. Braus NA, Elliott DE. Advances in the pathogenesis and treatment of IBD. *Clin Immunol* 2009;132:1-9.
2. Baumgart DC. The diagnosis and treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dtsch Arztebl Int* 2009;106:123-33.
3. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007;448:427-34.
4. Yamamoto-Furusho JK, Podolsky DK. Innate immunity in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007;13:5577-80.
5. Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med* 1997;337:1029-35.
6. van Deventer SJ. Immunomodulation of Crohn's disease using TNF-alpha neutralizing monoclonal antibodies. *Clin Nutr* 1997;16:271-5.
7. Fedorak RN, Gangl A, Elson CO, et al. Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease. The Interleukin 10 Inflammatory Bowel Disease Cooperative Study Group. *Gastroenterology* 2000;119:1473-82.
8. Moore KW, de Waal MR, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683-765.
9. Gasche C, Bakos S, Dejaco C, Tillinger W, Zakeri S, Reinisch W. IL-10 secretion and sensitivity in normal human intestine and inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol* 2000;20:362-70.
10. Oshima T, Laroux FS, Coe LL, et al. Interferon-gamma and interleukin-10 reciprocally regulate endothelial junction integrity and barrier function. *Microvasc Res* 2001;61:130-43.
11. Lindsay JO, Ciesielski CJ, Scheinin T, Hodgson HJ, Brennan FM. The prevention and treatment of murine colitis using gene therapy with adenoviral vectors encoding IL-10. *J Immunol* 2001;166:7625-33.
12. Barbara G, Xing Z, Hogaboam CM, Gauldie J, Collins SM. Interleukin 10 gene transfer prevents experimental colitis in rats. *Gut* 2000;46:344-9.
13. Lindsay J, Van MC, Brennan F, et al. IL-10 gene therapy prevents TNBS-induced colitis. *Gene Ther* 2002;9:1715-21.
14. Lindsay JO, Sandison A, Cohen P, Brennan FM, Hodgson HJ. IL-10 gene therapy is therapeutic for dextran sodium sulfate-induced murine colitis. *Dig Dis Sci* 2004;49:1327-34.
15. Sasaki M, Mathis JM, Jennings MH, et al. Reversal of experimental colitis disease activity in mice following administration of an adenoviral IL-10 vector. *J Inflamm (Lond)* 2005;2:13.
16. Schreiber S, Fedorak RN, Nielsen OH, et al. Safety and efficacy of recombinant human interleukin 10 in chronic active Crohn's disease. Crohn's Disease IL-10 Cooperative Study Group. *Gastroenterology* 2000;119:1461-72.
17. Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* 1999;6:1258-66.
18. Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990;247:1465-8.
19. Hickman MA, Malone RW, Lehmann-Bruinsma K, et al. Gene expression following direct injection of DNA into liver. *Hum Gene Ther* 1994;5:1477-83.
20. Meyer KB, Thompson MM, Levy MY, Barron LG, Szoka FC, Jr. Intratracheal gene delivery to the mouse airway: characterization of plasmid DNA expression and pharmacokinetics. *Gene Ther* 1995;2:450-60.
21. Zhang G, Vargo D, Budker V, Armstrong N, Knechtle S, Wolff JA. Expression of naked plasmid DNA injected into the afferent and efferent vessels of rodent and dog livers. *Hum Gene Ther* 1997;8:1763-72.
22. Choate KA, Khavari PA. Direct cutaneous gene delivery in a human genetic skin disease. *Hum Gene Ther* 1997;8:1659-65.
23. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993;69:238-49.
24. Dieleman LA, Palmem MJ, Akol H, et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 1998;114:385-91.
25. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on

- myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 1984;87:1344-50.
26. Tomoyose M, Mitsuyama K, Ishida H, Toyonaga A, Tanikawa K. Role of interleukin-10 in a murine model of dextran sulfate sodium-induced colitis. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:435-40.
 27. Melgar S, Karlsson A, Michaelsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G1328-G1338.
 28. Hodges BL, Taylor KM, Joseph MF, Bourgeois SA, Scheule RK. Long-term transgene expression from plasmid DNA gene therapy vectors is negatively affected by CpG dinucleotides. *Mol Ther* 2004;10:269-78.
 29. Yew NS, Przybylska M, Ziegler RJ, Liu D, Cheng SH. High and sustained transgene expression in vivo from plasmid vectors containing a hybrid ubiquitin promoter. *Mol Ther* 2001;4:75-82.
 30. Yew NS, Zhao H, Przybylska M, et al. CpG-depleted plasmid DNA vectors with enhanced safety and long-term gene expression in vivo. *Mol Ther* 2002;5:731-8.
 31. Higuchi N, Maruyama H, Kuroda T, et al. Hydrodynamics-based delivery of the viral interleukin-10 gene suppresses experimental crescentic glomerulonephritis in Wistar-Kyoto rats. *Gene Ther* 2003;10:1297-310.
 32. Hong IC, Mullen PM, Precht AF, et al. Non-viral human IL-10 gene expression reduces acute rejection in heterotopic auxiliary liver transplantation in rats. *Microsurgery* 2003;23:432-6.
 33. Hodges BL, Scheule RK. Hydrodynamic delivery of DNA. *Expert Opin Biol Ther* 2003;3:911-8.
 34. Axelsson LG, Landstrom E, Bylund-Fellenius AC. Experimental colitis induced by dextran sulphate sodium in mice: beneficial effects of sulphasalazine and olsalazine. *Aliment Pharmacol Ther* 1998;12:925-34.
 35. Krieglstein CF, Cerwinka WH, Laroux FS, et al. Role of appendix and spleen in experimental colitis. *J Surg Res* 2001;101:166-75.
 36. Melgar S, Karlsson L, Rehnstrom E, et al. Validation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis using four therapeutic agents for human inflammatory bowel disease. *Int Immunopharmacol* 2008;8:836-44.
 37. Morteau O, Morham SG, Sellon R, et al. Impaired mucosal defense to acute colonic injury in mice lacking cyclooxygenase-1 or cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 2000;105:469-78.
 38. Hartman ZC, Appledorn DM, Amalfitano A. Adenovirus vector induced innate immune responses: impact upon efficacy and toxicity in gene therapy and vaccine applications. *Virus Res* 2008;132:1-14.
 39. Seregin SS, Appledorn DM, McBride AJ, et al. Transient pretreatment with glucocorticoid ablates innate toxicity of systemically delivered adenoviral vectors without reducing efficacy. *Mol Ther* 2009;17:685-96.
 40. Benihoud K, Saggio I, Opolon P, et al. Efficient, repeated adenovirus-mediated gene transfer in mice lacking both tumor necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha. *J Virol* 1998;72:9514-25.
 41. David A, Coupel-Claude H, Chetritt J, et al. Anti-adenovirus immune responses in rats are enhanced by interleukin 4 but not interleukin 10 produced by recombinant adenovirus. *Hum Gene Ther* 1998;9:1755-68.
 42. Yang Y, Ertl HC, Wilson JM. MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses. *Immunity* 1994;1:433-42.
 43. Zhang HG, Zhou T, Yang P, Edwards CK, III, Curiel DT, Mountz JD. Inhibition of tumor necrosis factor alpha decreases inflammation and prolongs adenovirus gene expression in lung and liver. *Hum Gene Ther* 1998;9:1875-84.
 44. Flaherty DM, Hinde SL, Monick MM, et al. Adenovirus vectors activate survival pathways in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:L393-L401.
 45. Colombel JF, Rutgeerts P, Malchow H, et al. Interleukin 10 (Tenovil) in the prevention of postoperative recurrence of Crohn's disease. *Gut* 2001;49:42-6.
 46. Tilg H, Van MC, van den EA, et al. Treatment of Crohn's disease with recombinant human interleukin 10 induces the proinflammatory cytokine interferon gamma. *Gut* 2002;50:191-5.
 47. Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy - Review of a new approach. *Pharmacol Rev* 2003;55:241-69.

*¿Hasta qué punto es factible plantear
readministraciones de vectores virales de
expresión de IL-10?*



Capítulo 2

*Impact of IL-10 in the host immune responses towards
adenoviral vector readministrations*

IMPACT OF IL-10 IN THE HOST IMMUNE RESPONSES TOWARDS ADENOVIRAL VECTOR READMINISTRATIONS

ABSTRACT

BACKGROUND: The use of Adenoviruses (Ad) as gene therapy vectors is hampered by the transient nature of Ad-mediated transgene expression which is partly due to the host's innate and adaptive immune responses to capsid proteins and to the transgene products. IL-10-based gene therapy using adenoviral vectors has been proposed to address a number of inflammatory conditions.

AIM: We intended to measure host cellular and humoral adaptive immune responses generated after multiple administrations of Ad5 vectors carrying the immunomodulatory IL-10 gene or a non-immunomodulatory gene (*green fluorescent protein*), and to compare such responses to those exhibited by non-immunized control mice.

METHODS: Naïve CD1 mice received three challenges (two i.p. injections on days 0 and 30, and a third injection given i.v. on day 45) with 5×10^9 PP of E1-deleted Ad5 vectors or saline before euthanasia, which was performed three days after the last challenge. Anti-Ad neutralizing antibodies (anti-AdNAbs) were quantified in sera. We also measured the T and B cell proliferative and cytokine-releasing capacity of cultured splenocytes stimulated with concanavalin A (ConA) or lipopolysaccharide (LPS) and re-exposed to the viral antigen (Ag) (*i.e.*, Ad5GFP).

RESULTS: Compared to that of naïve mice, animals receiving triple Ad5IL-10 administration exhibited a reduced proliferative response of both T and B cells, and a decrease in the titer of anti-AdNAbs, which was similar to that found in mice receiving the Ad5 β -gal only once. The levels of the T_H2 cytokines IL-10 and IL-4 were higher in the triple Ad5IL-10 group particularly after Ag-specific stimulation. The levels of IFN- γ and TNF α were similar to those found in all other experimental groups. The IFN- γ /IL-10 ratio in the triple Ad5IL-10 group showed the lowest values after exposure to the Ag. This experimental group had also a low IgG_{2a}/IgG₁ ratio suggesting T_H1 suppression and a dominant role of the T_H2 profile. The relative T_H2 dominance correlated with the number of Ad5IL-10 injections (*i.e.*, higher in the triple *versus* double Ad5IL-10 administered group of mice).

CONCLUSION: These results show that IL-10 exerts potent immunomodulatory effects, diminishing the cellular and humoral host immune responses after multiple administrations of the Ad5IL-10 vector, reducing the specific T and B cell proliferative responses and the titer of anti-AdNAbs. The suppression of the T_H1 response found upon multiple Ad5IL-10 administrations suggests that Ad5IL-10 might be successfully used for the treatment of several chronic inflammatory disorders.

INTRODUCTION

Replication-deficient recombinant adenoviruses (Ad) are widely used vectors for *in vivo* gene delivery to both dividing and quiescent cells, and are able to elicit high levels of transgene expression [1-3]. They are thus sought as putative powerful tools to treat both genetic and acquired diseases, as well as a novel method for vaccination and cancer gene therapy. However, the so-called first generation adenoviral vectors have encountered serious limitations in preclinical and clinical gene therapy trials due to the strong host cellular and humoral immune responses directed to both adenoviral proteins and to the transgene [4-6].

In wild type Ad, early genes (E1 and E3) modulate the host innate immune responses by suppressing transcriptional activation of interferon-stimulated genes and by inhibiting MHC I expression and antigen presentation [7]. This results in viral evasion of the host immune response. Since gene therapy vectors are generally E1- and E3-deleted they cannot evade the host immune response and are thus easily eliminated.

First generation Ad5 is thus able to elicit innate and adaptive immune responses in the host; this results in a shorter lasting transgene expression and prevents subsequent vector readministrations [1, 7]. It is well known that Ad5 administered intravenously (i.v.) transduces mainly the liver [8, 9] and that liver resident macrophages (*i.e.*, Kupffer cells) are responsible for the vast majority of Ad clearance within the first day after its systemic administration [1, 4, 10-12].

The innate immune response exerted after Ad infection is dose-dependent and is characterized by complement activation and by the production of proinflammatory cytokines (IL-12, IL-6, TNF α , IFN- γ , IL-1 β , *etc.*) [7, 13-15]. This inflammatory response is independent of specific recognition of viral antigens or viral gene expression [16, 17]. On the contrary, the adaptive immune response begins after viral immune-recognition, starting on day 3-5 post-administration and becoming stronger thereafter [7, 15, 18], and is commonly regarded as the main cause of the short-lived transgene expression in experimental animals.

The intensity of the host immune response is dependent on the route of administration -with the highest responses attained after intravenous injection- [19-22], the target tissue, the vector design [15, 23], the dose administered [24], the nature of the transgene employed [23], the host immune status [23], the host species and strain [15, 23, 25] or the existence of a cytokine-rich environment in the target tissue [15].

The anti-adenoviral humoral immune response (measured by the existence of anti-Ad neutralizing antibodies, anti-AdNAbs, mainly generated 2 to 4 weeks after vector injection) modifies the transduction efficacy of the vector and limits the effectiveness of subsequent administrations [26]. However, full vector neutralization requires neutralizing antibodies (NAbs) against major capsid proteins (hexon, penton and fiber) [27, 28].

Several strategies have been designed and used in clinical trials to circumvent these host immune responses and to improve the safety profile of these vectors. Dose reduction, use of alternate serotypes, modification of adenoviral capsid proteins and immunotolerization, among others, have been employed to effectively improve vector efficiency and permit readministrations [3, 28-34]. The use of an IL-10-like cytokine of viral origin was shown to reduce the T_H1/T_H2 ratio and to inhibit the cellular component of the immune response [35]. Finally, depletion of $CD4^+$ T lymphocytes prior to systemic Ad injection has been shown to reduce the host humoral immune response upon readministrations in mice [36].

In this study we propose the use of an E1-deleted Ad5 encoding the murine IL-10 in order to minimize host inflammatory responses towards the adenoviral vector after repetitive administrations.

MATERIALS AND METHODS

Animals

CD1 healthy female and male mice (8-10 weeks old, 26-28 g body weight) purchased from Charles River (Lyon, France) were employed in these studies. Mice were kept under specific pathogen-free conditions in a protected autonomous unit throughout the experimental period with free access to food (A04 chow, PanLab, Barcelona) and water, and maintained under a 12 hours light/12 hours dark cycle, under standard conditions of 22°C and 70-80% relative humidity. Mice were acclimatized for at least one week before entering the study.

All experiments involving animals were approved by the Ethical Committee and the Biosafety Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona.

In vivo adenoviral administration

On the initial day (day 0) animals received either saline (SSF, 100 μ L) or the corresponding E1-deleted Ad5 (5×10^9 PP in 100 μ L SSF) intraperitoneally (*first immunization*). The same procedure was performed 30 days later (*second immunization*). The third and last administration was performed two weeks later (on day 45) and animals were injected intravenously (tail vein) with 100 μ L SSF or 5×10^9 PP Ad diluted in 100 μ L SSF. Saline was employed as control. To avoid interferences due to antibodies raised against transgene products, green fluorescent protein (GFP) was used in the first two administrations, whereas *E. coli* β -galactosidase (*LacZ*) was the transgene in the last administration. See **table 1** and **figure A** for a detailed study design description. 43 mice were employed in this study.

GROUP	TREATMENT	# OF ANIMALS	DOSE
SSF / SSF / SSF	SSF i.p./SSF i.p./SSF i.v.	4	100 μ L SSF
SSF / SSF / Ad5 β -gal	SSF i.p./SSF i.p./Ad5 β -gal i.v.	9	100 μ L SSF/ 5×10^9 PP in 100 μ L SSF
Ad5GFP / Ad5GFP / Ad5 β -gal	Ad5GFP i.p./Ad5GFP i.p./Ad5 β -gal i.v.	9	5×10^9 PP in 100 μ L SSF
Ad5IL-10 / Ad5IL-10 / Ad5 β -gal	Ad5IL-10 i.p./Ad5IL-10 i.p./Ad5 β -gal i.v.	11	5×10^9 PP in 100 μ L SSF
Ad5IL-10 / Ad5IL-10 / Ad5IL-10	Ad5IL-10 i.p./Ad5IL-10 i.p./Ad5IL-10 i.v.	10	5×10^9 PP in 100 μ L SSF

TABLE 1: *Groups and number of animals employed, treatment and dose used.* Numbers indicate the amount of animals employed for *in vitro* studies.

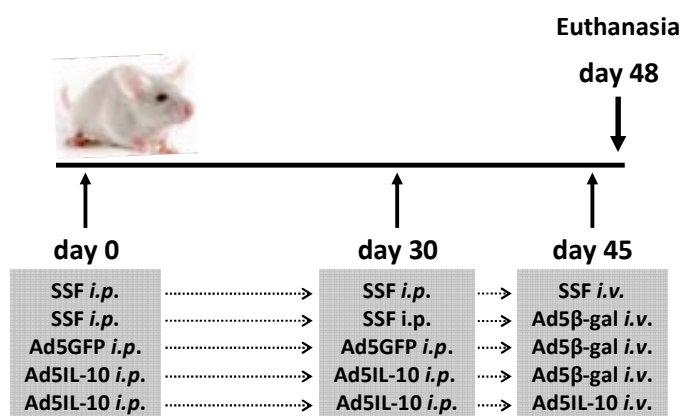


FIGURE A: EXPERIMENTAL DESIGN.

Healthy CD1 mice were employed for the study of the host immune responses exerted after Ad5 immunization with multiple vector administrations as indicated (two i.p. on days 0 and 30, and the last i.v. on day 45). Mice were euthanized 3 days after the last injection and host humoral and cellular immune responses were studied *in vitro*.

Euthanasia and splenocyte culture

Mice were euthanized three days after the last injection (day 48). Whole blood was collected by heart puncture under isoflurane (Isoba[®]vet, Shering-Plough) anesthesia. Sera were routinely decomplexed by heat inactivation at 56°C for 30 min.

Spleens from Ad5-treated and control mice were aseptically removed three days after the last administration (day 48) and homogenized in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Cat# 31966) plus 1% penicillin/streptomycin (penicillin/streptomycin liquid, Gibco, Cat.# 15070) in a sterile plastic dish. After a centrifugation step (350 *xg*, 5 min) erythrocytes were lysed with Lysing Buffer (BD Biosciences, Cat.# 555899) for 30 minutes at 4°C. The remaining cells were resuspended in 5 mL complete DMEM complemented with 10% foetal bovine serum (FBS, PAA, Cat.# A15-151) and counted using an automated hemocytometer (Invitrogen Countess[®] Automated Cell Counter). Approximately, 90% of total splenocytes were viable (trypan blue exclusion) prior to the beginning of the experiments.

Splenocyte stimulation and Ag-specific T and B cell proliferation assays

Splenocytes obtained as described above were seeded in 24-well plates (2.5x10⁶ cells/well, final volume of 450 μ L) for proliferation assays. Preliminary studies were performed to adjust appropriate culture times and concentrations.

T and B cells were cultured in the presence or absence of concanavalin A (ConA, Sigma, C5275) (5 μ g/mL) or in the presence or absence of high concentrations of lipopolysaccharide (LPS, Sigma, L-2630) (50 μ g/mL), respectively. Incubation was performed under a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C during 48 hours. ConA is a polyclonal activator of the T cell receptor inducing activation of all signaling pathways in this cell type increasing the production of cytokines such as TNF α , IFN- γ and IL-10. LPS leads to the stimulation of B lymphocytes, promoting their selective proliferation and the secretion of immunoglobulins [37]. Additionally, either T cells (preselected by ConA stimulation) or B cells (preselected by LPS stimulation) were challenged with Ad5GFP at 10 MOI (multiplicity of infection) to measure the extent of proliferation induced by re-exposure to the specific antigen. Hence, a total of 5 (experimental animal groups) x 3 (unstimulated, ConA or LPS stimulations) x 2 (Ag challenge or not) experimental groups were obtained (*i.e.*, 30 groups).

The Ad5GFP-specific lymphoproliferative capacity was estimated by the uptake of [5'-³H] thymidine (1 μ Ci/well) (Amersham, TRK328). Forty-eight hours after stimulations and addition of [5'-³H] thymidine, cell-full supernatants of the aforementioned 24-well plates were harvested and centrifuged 5 min at 350 *xg*. After two washes with trichloroacetic acid (TCA, Panreac, Cat.# 131067), 500 μ L of SDS 1% (sodium dodecyl sulphate, Invitrogen, Cat.# 24730-020) / NaOH 1N (sodium hydroxide, Panreac, Cat.# 303126) were added to samples and incubated 30 min at room temperature with continuous stirring. Samples were transferred to vials containing 8 mL EcoLume[™] Liquid Scintillation fluid (MP Biomedicals, Cat.# 0188247005) and counted in a WALLAC1410 Liquid Scintillation counter (Pharmacia). Proliferation (Δ dpm, disintegrations per minute) was calculated as follows:

$$\Delta \text{ dpm} = \frac{\text{mean dpm with stimulation (ConA, LPS)}}{\text{mean dpm without stimulation}} \quad \text{OR} \quad \frac{\text{mean dpm with stimulation (ConA, LPS) and Ag (Ad5GFP at 10 MOI)}}{\text{mean dpm without stimulation, with Ag}}$$

Cytokine and Immunoglobulin assays

Splenocytes obtained as described above were seeded in 6-well plates (9×10^6 cells/well, final volume of 3 mL) for cell-free supernatant collection.

Mouse ELISA kits (Bender Medsystems) were used as described in the manufacturer's protocol in duplicates for all experimental conditions. TNF α (BMS607/2INST) and IFN- γ (BMS606INST) were measured as T_H1 cytokines, and IL-10 (BMS614/2INST) and IL-4 (BMS613INST) concentrations, as T_H2 cytokines.

B cell immunoglobulin-releasing capacities were evaluated by measuring IgG₁ and IgG_{2a} concentrations in cell-free supernatants of LPS stimulated splenocytes after 72 hours incubation, using established mouse ELISA kits (Kamiya). IgG₁ (KT-403) was measured as a T_H2 marker and IgG_{2a} (KT-404), as a T_H1 marker. Duplicate assays for respective conditions were performed.

The absorbances at 450 nm were read in an automatic plate spectrophotometer (Tecan Infinite F200). The concentration of cytokines and immunoglobulins in the supernatants were determined from the corresponding standard curve.

Control sera, target cells and adenoviruses for Ad neutralization assays

Control serum (CS) was obtained from naïve CD1 healthy female mice (8-10 weeks old, 26-28 g) purchased from Charles River (Lyon, France). Animals were euthanized and whole blood collected as previously described. Sera from these animals (naïve mice) was pooled, heat inactivated (56°C, 30 min) and used as diluent in assays intended to estimate the concentration of neutralizing anti-Ad antibodies (anti-AdNAbs) in sera of Ad-treated animals (*i.e.*, experimental sera) and for the positive control in the neutralizing anti-Ad antibody assay (see below).

A549 human lung carcinoma cells (American Type Culture Collection, ATCC, Cat.# CCL-185™) were chosen as target cell since they are permissive to Ad infection but do not allow Ad replication. Such cells were seeded in 6-well plates (5×10^5 cells/well) until 80% confluence. Ad5GFP was used for cell infection at a ratio of 12 PP/cell, according to preliminary optimization tests. This PP/cell ratio allowed a standardized infection percent in the target cell between 7 and 10 percent. Since anti-AdNAbs are directed against Ad capsid proteins and are unrelated to Ad infective capacity, the viral doses were adjusted as PP (physical particles) and not as IU (infection units).

Anti-Ad neutralization antibody (anti-AdNAb) assay

Eight serial dilutions of experimental sera (ES) (from undiluted to 1/10,000), in duplicates, were made using naïve CS as diluent. Each dilution was incubated with the corresponding amount of Ad5GFP (at 12 PP/cell) for 45 min at 37°C. Subsequently, each sample was added to the designated well in duplicates and filled with infection medium (DMEM + 2% FBS + 2% Pen/Strept + 1% non-essential aminoacids) to a final volume of 825 μ L per well. Plates were incubated 48 hours under a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C. No ES and no Ad5GFP were added to the negative controls, which were considered the *background value* (null Ad5GFP infection capacity). Two positive controls (C+), in which Ad5GFP (12 PP/well) was added, were performed to test any possible interference of CS in adenoviral infection: one, using PBS as diluent and the other employing undiluted CS from

naïve mice (*100% infection value*). These positive controls equalled the maximal Ad5GFP infection capacity. The value of the second positive control (with naïve CS) was used to calculate the average neutralizing ability of sera taken from Ad-treated animals.

After medium removal, A549 cells were trypsinized, washed with PBS, centrifuged and resuspended in 300 µL PBS / 2% formaldehyde solution. Infection was determined as the number of GFP-positive cells by flow cytometry (readout of 300,000 cells/sample) in a BD FACSCanto™ II instrument (Becton Dickinson) and analyzed with the BD FACSDiva™ software (Becton Dickinson). For each ES dilution, the percentage of infection was calculated as follows:

$$\text{Percent infection} = \frac{\text{experimental value} - \text{background value (without Ad5GFP)}}{\text{positive control (100\% infection)} - \text{background value (without Ad5GFP)}} \times 100$$

The titer of anti-AdNAbs for each experimental serum sample was defined as the highest dilution resulting in a percentage of infection below 50% of C+ infection value (IC₅₀).

Viability assay

Splenocyte viability after culture was measured using the violet ViViD viability marker (Live/Dead® Fixable Dead Cell Stain kit, L34955, Invitrogen). Cell-full supernatants were centrifuged (1000 xg, 5 min), washed with 1 mL PBS and resuspended with violet ViViD (1/2000 in PBS). After 20 min incubation and a second wash with PBS, cells were centrifuged (1000 xg, 5 min), thoroughly resuspended in 300 µL PBS / 2% formaldehyde solution and analyzed by flow cytometry as stated before.

Statistical analysis

All the data obtained were plotted and statistically analyzed using the GraphPad Prism 4.0 software. Levels for serum antibodies, cytokines and IgGs were considered as continuous variables for evaluation. Comparison of mean values between different groups of animals was made using one-Way or two-Way ANOVA followed by multiple-comparison Bonferroni's post-test. P values <0.05 were considered statistically significant.

Figure 2 shows the mean increase in T and B cell proliferation values (Δ dpm) for each experimental group. **Figure 3** illustrates the mean splenocyte survival in each group after re-exposure with the Ag during 48 hours. These results demonstrate that the low proliferative response found in the triple Ad5IL-10 group is not due to decreased cell viability.

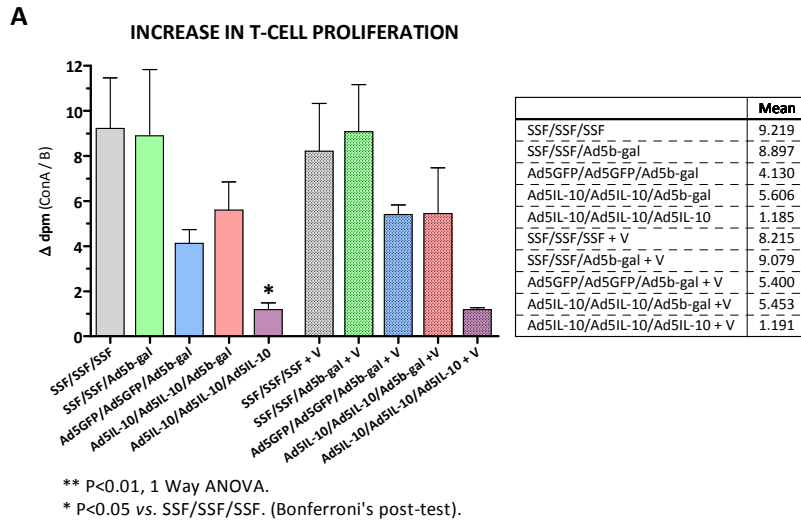


FIGURE 2: Increase in T and B cell proliferation (Δ dpm).

These values are obtained as detailed in Mat & Met.

A) Increase in T cell proliferation, Δ dpm (ConA / B).

B) Increase in B cell proliferation, Δ dpm (LPS / B).

Results are expressed as mean + SEM. Mean values for each experimental condition are detailed in table.

B, (blank) unstimulated condition.

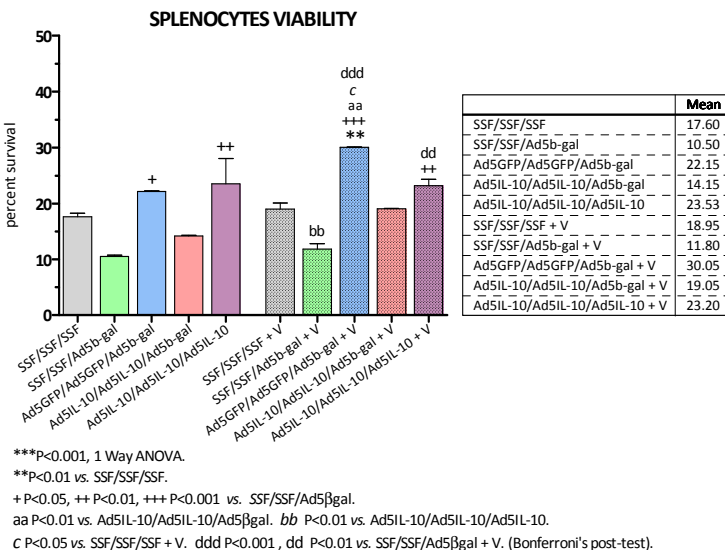
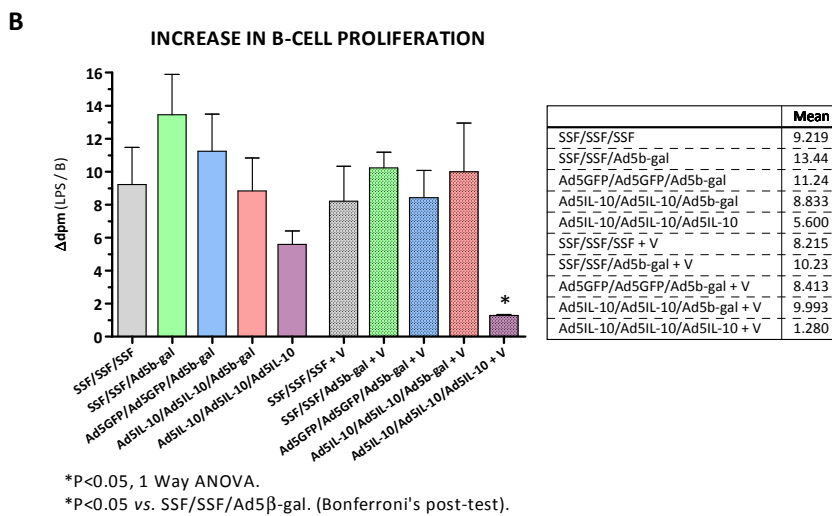


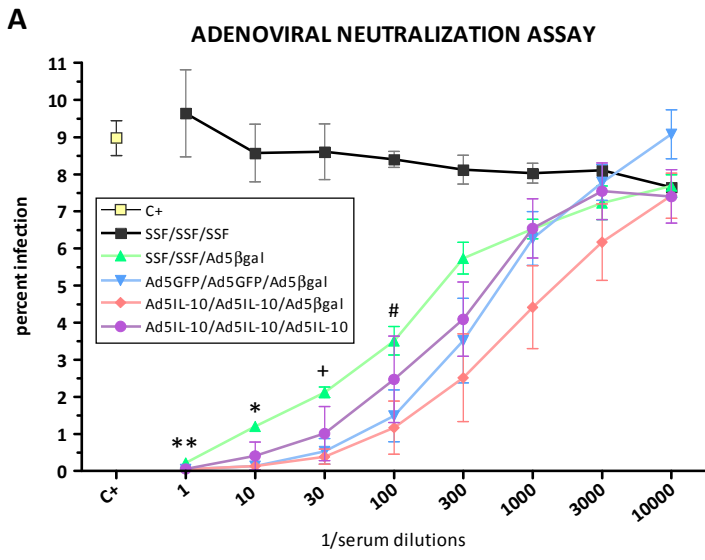
FIGURE 3: Mean splenocyte viability.

Splenocyte viability was measured 48 hours after stimulations using ViViD as the viability marker. Results were read in a BD FACSCanto™ II instrument (Becton Dickinson).

Results are expressed as mean + SEM. Mean values for each experimental condition are also given in the table.

Humoral response to repeated administration of Ad5 carrying IL-10 or GFP

Ad neutralization assay revealed lower titers of specific anti-Ad5NAbs in the triple Ad5IL-10 group when compared to Ad5GFP/Ad5GFP/Ad5β-gal and the double Ad5IL-10 group (**figure 4**). From the 1/10 and 1/30 dilutions the percent infection in mice of the triple Ad5IL-10 group was similar to that obtained in mice exposed only once to Ad5 (*i.e.*, SSF/SSF/Ad5β-gal) (figure 4B). The relative decline in percent infections seen in the control group (naïve mice) is attributable to inter-assay variability.



*** P<0.001, 2 Way ANOVA.
 ** P<0.01 & * P<0.05 SSF/SSF/Ad5βgal, Ad5GFP/Ad5GFP/Ad5βgal, Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5βgal & Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5βgal vs. SSF/SSF/SSF.
 + P<0.05 Ad5GFP/Ad5GFP/Ad5βgal & Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5βgal vs. SSF/SSF/SSF.
 # P<0.05 Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5βgal vs. SSF/SSF/SSF. (Bonferroni's post-test).

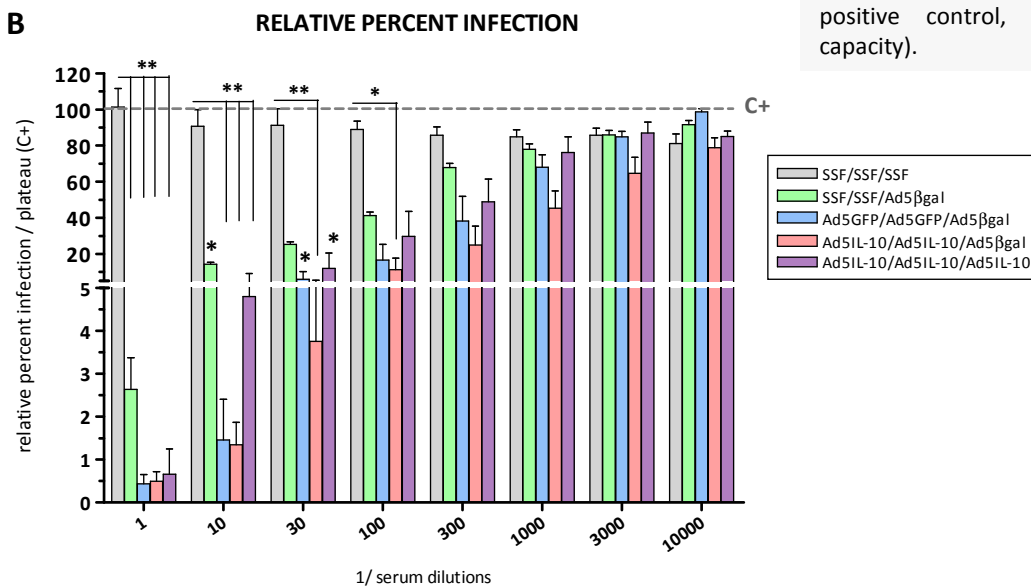
FIGURE 4: Ad5 Neutralization Assay.

A549 cells were cultured with serial dilutions of serum corresponding to mice reinfected with Ad5IL-10 or Ad5 encoding a non-immunoregulatory transgene. After Ad5GFP addition (12 PP/well), cytometric analysis (GFP+ cells) allowed to estimate the infection percent.

A) Each dot represents the mean value of animals of the same group obtained in the respective serum dilution. Mean control positive (C+) value is also represented. Results are expressed as mean ± SEM.

B) Relative infection normalized to the maximal infection percent achieved (*i.e.*, C+ percent infection, *plateau*).

Infection percents of experimental samples of each group were normalized according to the mean infection percent of the positive control, C+ (100% infection capacity).



*** P<0.001, 2 Way ANOVA.
 ** P<0.01 & * P<0.05 SSF/SSF/Ad5βgal, Ad5GFP/Ad5GFP/Ad5βgal, Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5βgal, Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5IL-10 vs. SSF/SSF/SSF. (Bonferroni's post-test).

Figure 5 shows the specific anti-Ad5NAbs titers calculated as percent inhibition of Ad5GFP infection with increased exposures to Ad5 (*i.e.*, reflected as reduction in Ad5GFP percent infection). Serum taken from naïve mice did not modify the percent infection. Mice exposed only once to Ad5 β -gal exhibited a high titer of NAb (IC₅₀ values with sera diluted 1/100) (**figure 5, table 2**). The titer of NAb found in sera of animals treated with two or three injections of Ad5IL-10 was higher than expected. As shown in figure 5 and table 2, the double Ad5IL-10 group (*i.e.*, Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5 β -gal) had the highest mean anti-AdNAb titer when compared to the rest of experimental groups.

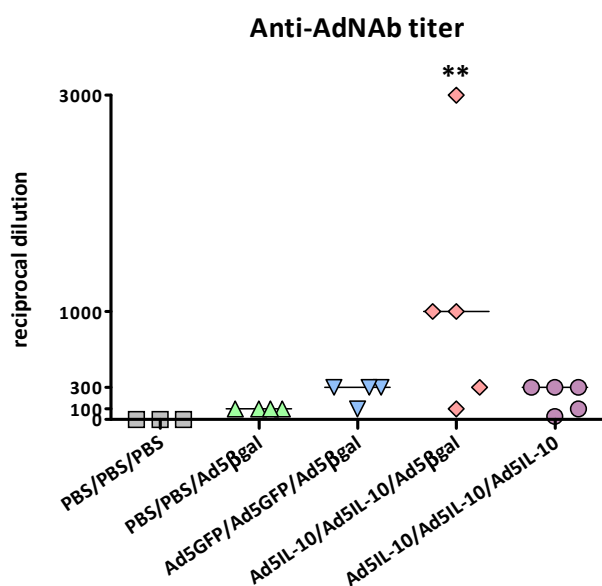


FIGURE 5: The humoral immune response to Ad5 infection.

In vitro neutralization of Ad infection was determined for each serum dilution of mice reinfected with Ad5IL-10 or Ad5 encoding a non-immunoregulatory transgene.

Each dot represents the Ab titer (*i.e.*, reciprocal serum dilution, 1/x) from an individual animal and the horizontal line represents the median value for the corresponding group.

*P<0.5, Kruskal-Wallis.

**P<0.01 vs. PBS/PBS/PBS (Dunn's post-test).

	anti-AdNAbs titers
PBS/PBS/PBS	<10
PBS/PBS/Ad5 β -gal	100
Ad5GFP/Ad5GFP/Ad5 β -gal	300
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5 β -gal	1000
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5IL-10	100, 300

TABLE 2 : Anti-Ad5NAb titers. Numbers indicate the reciprocal (1/x) dilution that gave a 50% infection capacity in each group.

Influence of Ad5IL-10 and Ad5GFP administration regime on cytokine release

We next evaluated the cytokine- and immunoglobulin-releasing capacities of T and B cells, after respective ConA and LPS stimulation, and compared them with those obtained after re-exposure to the immunizing Ag (**figures 6A, 7A, 8A and 9A**). Two T_H1 (IFN- γ and

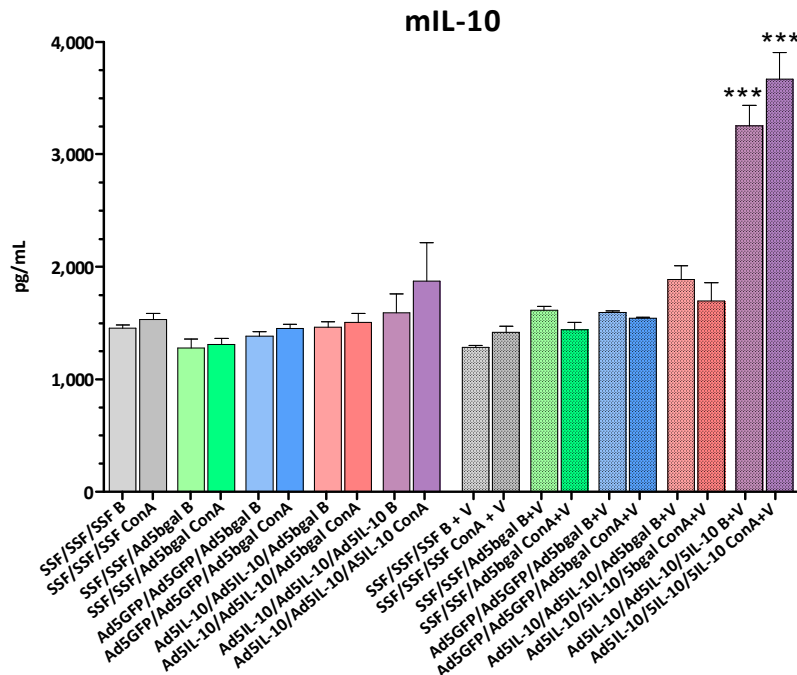
TNF α), two T_H2 cytokines (IL-10 and IL-4) as well as two immunoglobulins (IgG₁ and IgG_{2a}) were assayed in the supernatants of cultured splenocytes.

In mice treated with three injections of Ad5IL-10, IL-10 secretion was increased when compared to all other groups (**fig. 6A**). This enhanced IL-10 secretion was only evidenced upon challenging splenocytes with the Ag, and was even more evident when IL-10 levels were normalized to eliminate any influence due to the different degrees of proliferation found in each experimental group (**fig. 6B**). Thus, the amount of IL-10 secreted per cell was highest in the triple Ad5IL-10 group.

Regarding IL-4, the secretion levels were similar in all experimental groups (**fig. 7A**). However, when secretion levels were normalized according to proliferation, it was evidenced that animals receiving three injections of Ad5IL-10 secreted the highest amount of IL-4, particularly upon exposure to the antigen (**fig. 7B**). Again, a dose-related effect of IL-10 was evidenced (*i.e.*, higher in the triple *versus* double Ad5IL-10 administered mice).

Concerning IFN- γ secretion, all groups exhibited a significant increase upon ConA stimulation but no significant changes related to re-exposure to the antigen (**fig. 8A**). In contrast, for TNF α levels ConA stimulation did not increase its secretion in any experimental group though the amount of TNF α per cell was increased upon re-exposure to the antigen (**fig. 9A and 9B**). Basal levels of both IFN- γ (**fig. 8A**) and TNF α (**fig. 9A**) of naïve mice prior to specific T cell stimulation were significantly lower when compared to mice receiving either one or three Ad injections (irrespective of the transgene). IFN- γ levels were significantly higher in the triple Ad5IL-10 group only when values were normalized to cell proliferation (**fig. 8B**).

A

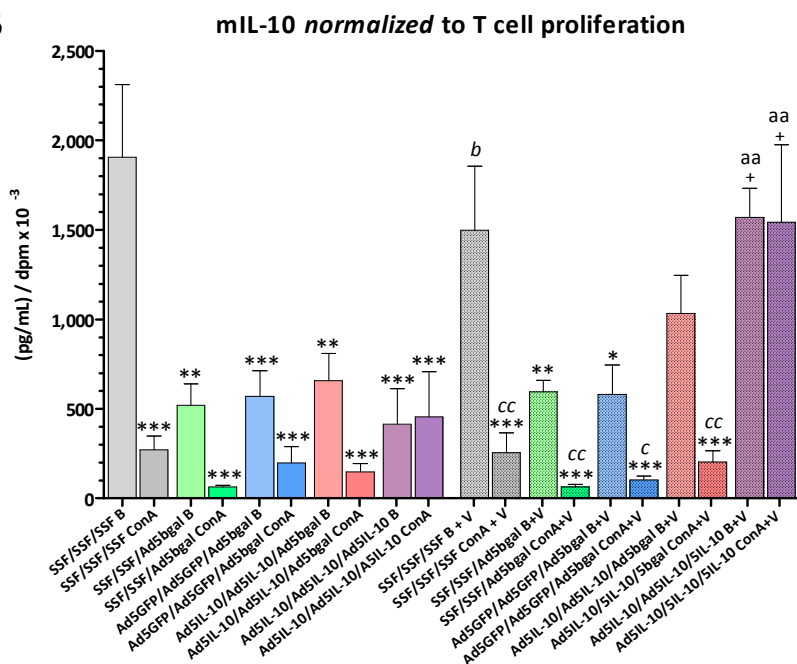


	Mean
SSF/SSF/SSF B	1456
SSF/SSF/SSF ConA	1530
SSF/SSF/Ad5βgal B	1280
SSF/SSF/Ad5βgal ConA	1309
Ad5GFP/Ad5GFP/Ad5βgal B	1382
Ad5GFP/Ad5GFP/Ad5βgal ConA	1453
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5βgal B	1462
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5βgal ConA	1506
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5IL-10 B	1589
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5IL-10 ConA	1873
SSF/SSF/SSF B + V	1283
SSF/SSF/SSF ConA + V	1417
SSF/SSF/Ad5βgal B+V	1613
SSF/SSF/Ad5βgal ConA+V	1440
Ad5GFP/Ad5GFP/Ad5βgal B+V	1592
Ad5GFP/Ad5GFP/Ad5βgal ConA+V	1543
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5βgal B+V	1888
Ad5IL-10/Ad5IL-10/5βgal ConA+V	1695
Ad5IL-10/Ad5IL-10/5IL-10 B+V	3254
Ad5IL-10/5IL-10/5IL-10 ConA+V	3668

*** P<0.001, 1 Way ANOVA.

*** P<0.001 vs. respective condition of all other groups . (Bonferroni's post-test).

B



	Mean
SSF/SSF/SSF B	1906
SSF/SSF/SSF ConA	270.9
SSF/SSF/Ad5βgal B	518.2
SSF/SSF/Ad5βgal ConA	64.33
Ad5GFP/Ad5GFP/Ad5βgal B	570.7
Ad5GFP/Ad5GFP/Ad5βgal ConA	197.1
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5βgal B	657.0
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5βgal ConA	147.9
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5IL-10 B	415.2
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5IL-10 ConA	455.6
SSF/SSF/SSF B + V	1498
SSF/SSF/SSF ConA + V	254.8
SSF/SSF/Ad5βgal B+V	595.5
SSF/SSF/Ad5βgal ConA+V	63.88
Ad5GFP/Ad5GFP/Ad5βgal B+V	579.5
Ad5GFP/Ad5GFP/Ad5βgal ConA+V	102.4
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5βgal B+V	1034
Ad5IL-10/Ad5IL-10/5βgal ConA+V	203.8
Ad5IL-10/Ad5IL-10/5IL-10 B+V	1569
Ad5IL-10/5IL-10/5IL-10 ConA+V	1542

*** P<0.001, 1 Way ANOVA.

*** P<0.001, ** P<0.01 and * P<0.05 vs. SSF/SSF/SSF B. + P<0.05 vs. SSF/SSF/Ad5βgal ConA and Ad5GFP/Ad5GFP/Ad5βgal ConA.

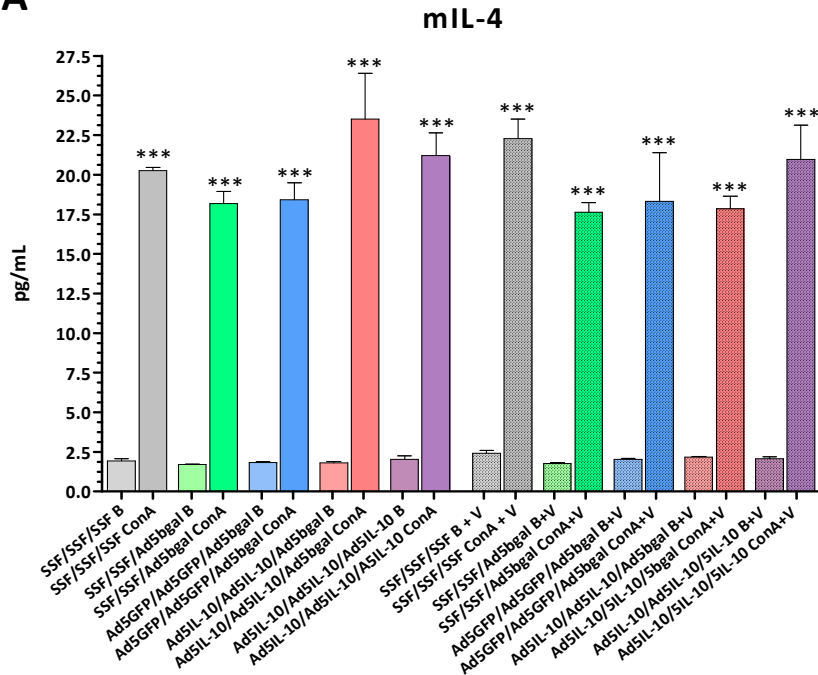
aa P<0.01 vs. Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5βgal ConA. b P<0.05 vs. Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5IL-10 B & ConA

cc P<0.01 and c P<0.05 vs. SSF/SSF/SSF B+V. (Bonferroni's post-tets).

FIGURE 6: IL-10 levels obtained in splenocytes after ConA stimulation in animals pre-immunized with Ad5.

A) IL-10 levels (pg/mL). **B)** IL-10 levels normalized to T cell proliferation ((pg/mL)/dpm x 10⁻³). Results are expressed as mean + SEM. **B**, (blank) unstimulated condition. **V**, (virus) Ad5GFP antigenic challenge.

A

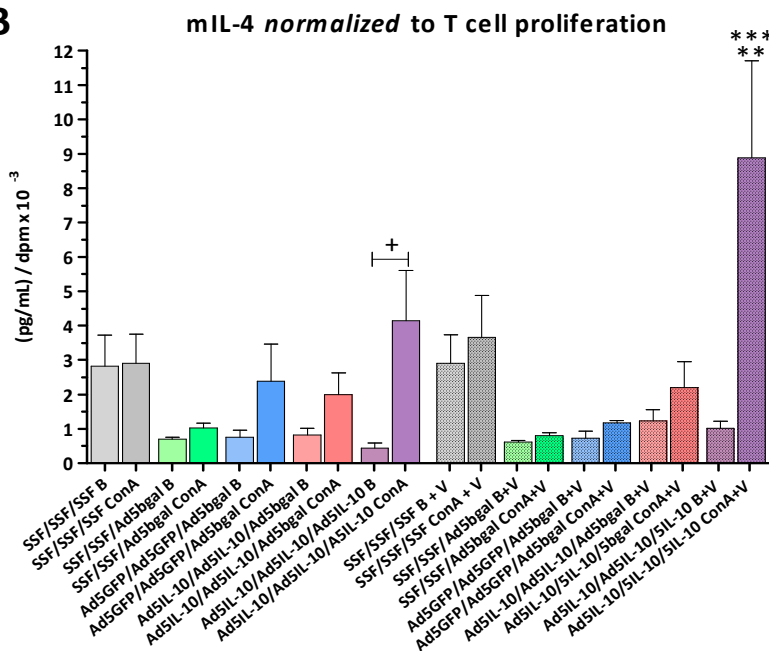


	Mean
SSf/SSf/SSf B	1.930
SSf/SSf/SSf ConA	20.24
SSf/SSf/Ad5bgal B	1.714
SSf/SSf/Ad5bgal ConA	18.17
Ad5GFP/Ad5GFP/Ad5bgal B	1.830
Ad5GFP/Ad5GFP/Ad5bgal ConA	18.40
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5bgal B	1.810
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5bgal ConA	23.51
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5IL-10 B	2.026
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5IL-10 ConA	21.20
SSf/SSf/SSf B + V	2.410
SSf/SSf/SSf ConA + V	22.26
SSf/SSf/Ad5bgal B+V	1.786
SSf/SSf/Ad5bgal ConA+V	17.62
Ad5GFP/Ad5GFP/Ad5bgal B+V	2.020
Ad5GFP/Ad5GFP/Ad5bgal ConA+V	18.31
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5bgal B+V	2.173
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5bgal ConA+V	17.84
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5IL-10 B+V	2.065
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5IL-10 ConA+V	20.96

*** P<0.001, 1 Way ANOVA.

*** P<0.001 ConA vs. corresponding B. (Bonferroni's post-test).

B



	Mean
SSf/SSf/SSf B	2.822
SSf/SSf/SSf ConA	2.910
SSf/SSf/Ad5bgal B	0.6990
SSf/SSf/Ad5bgal ConA	1.031
Ad5GFP/Ad5GFP/Ad5bgal B	0.7622
Ad5GFP/Ad5GFP/Ad5bgal ConA	2.378
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5bgal B	0.8137
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5bgal ConA	2.000
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5IL-10 B	0.4428
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5IL-10 ConA	4.150
SSf/SSf/SSf B + V	2.906
SSf/SSf/SSf ConA + V	3.656
SSf/SSf/Ad5bgal B+V	0.6162
SSf/SSf/Ad5bgal ConA+V	0.7964
Ad5GFP/Ad5GFP/Ad5bgal B+V	0.7310
Ad5GFP/Ad5GFP/Ad5bgal ConA+V	1.172
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5bgal B+V	1.229
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5bgal ConA+V	2.197
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5IL-10 B+V	1.012
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5IL-10 ConA+V	8.886

***P<0.001, 1 Way ANOVA.

** P<0.01 vs. SSf/SSf/SSf B, ConA, B+V and ConA+V. *** P<0.001 vs. rest of the groups,

+ P<0.05, Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5IL-10 ConA vs. Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5IL-10 B.

(Bonferroni's post-tets).

FIGURE 7: IL-4 levels obtained in splenocytes after ConA stimulation in animals pre-immunized with Ad5.

A) IL-4 levels (pg/mL). **B)** IL-4 levels normalized to T cell proliferation ((pg/mL)/dpm x 10⁻³). Results are expressed as mean + SEM. **B**, (blank) unstimulated condition. **V**, (virus) Ad5GFP antigenic challenge.

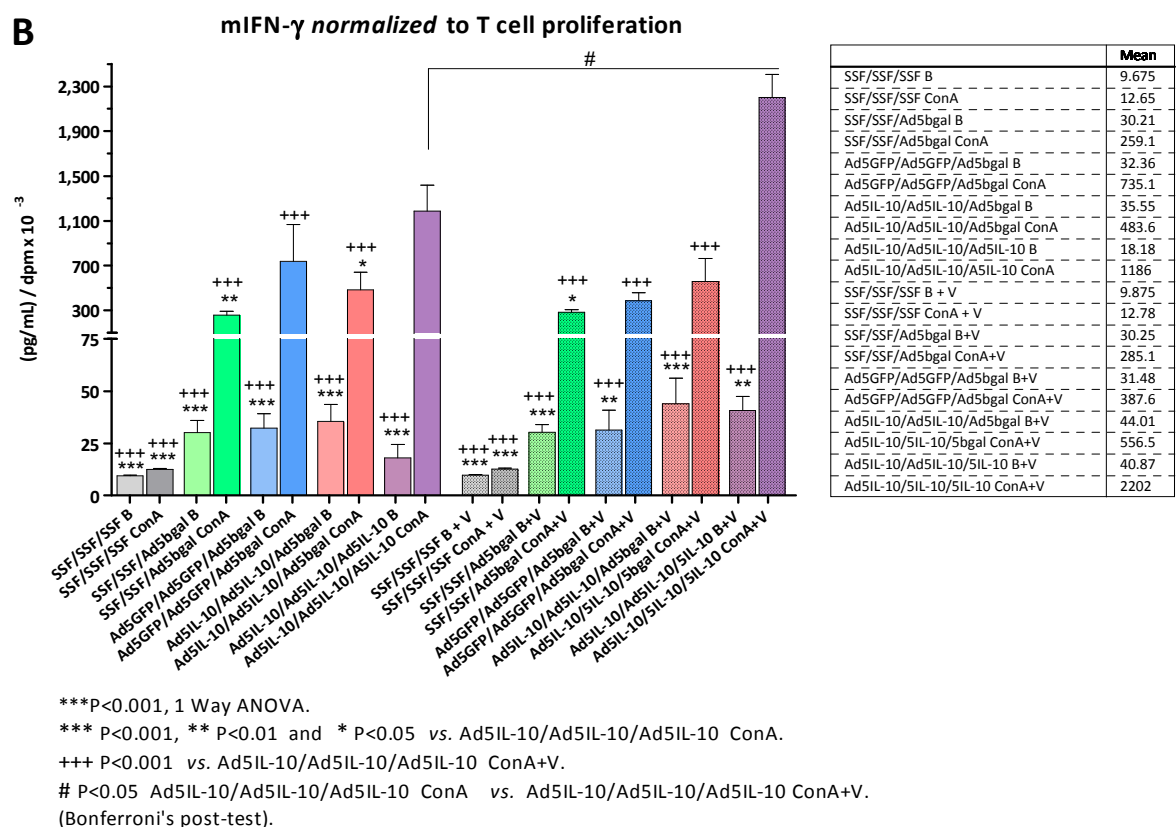
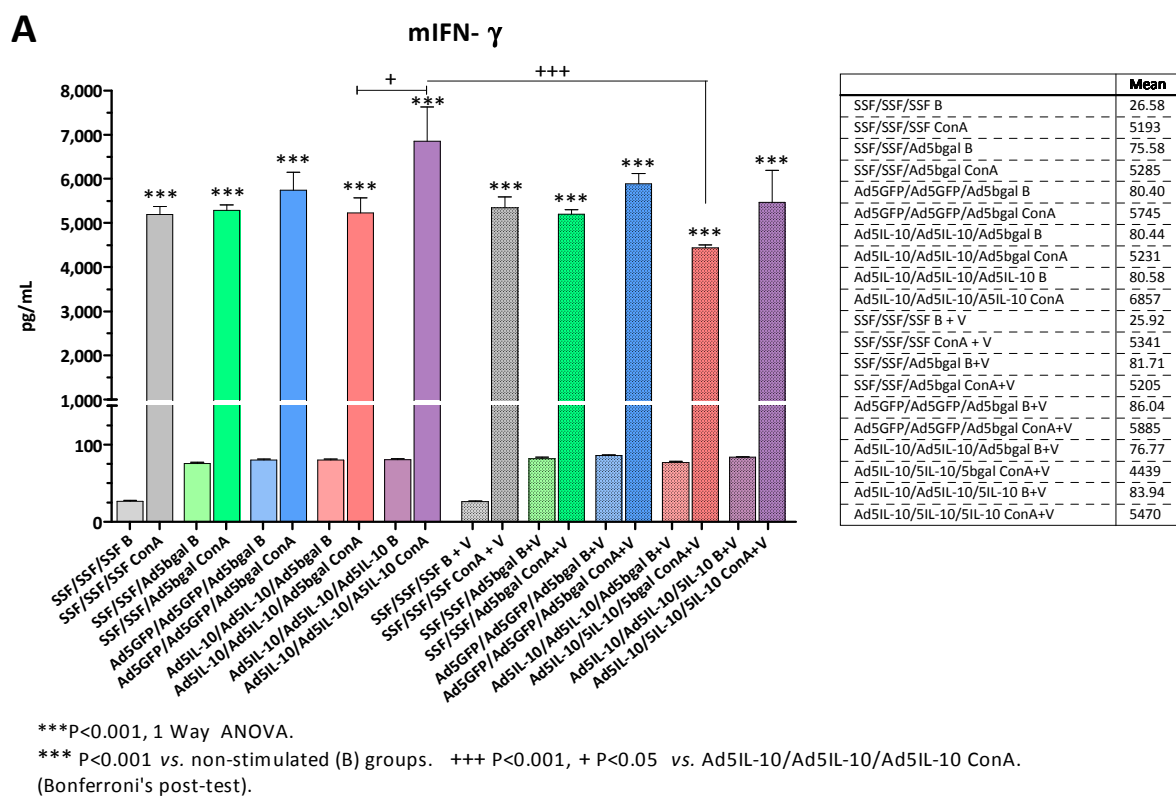
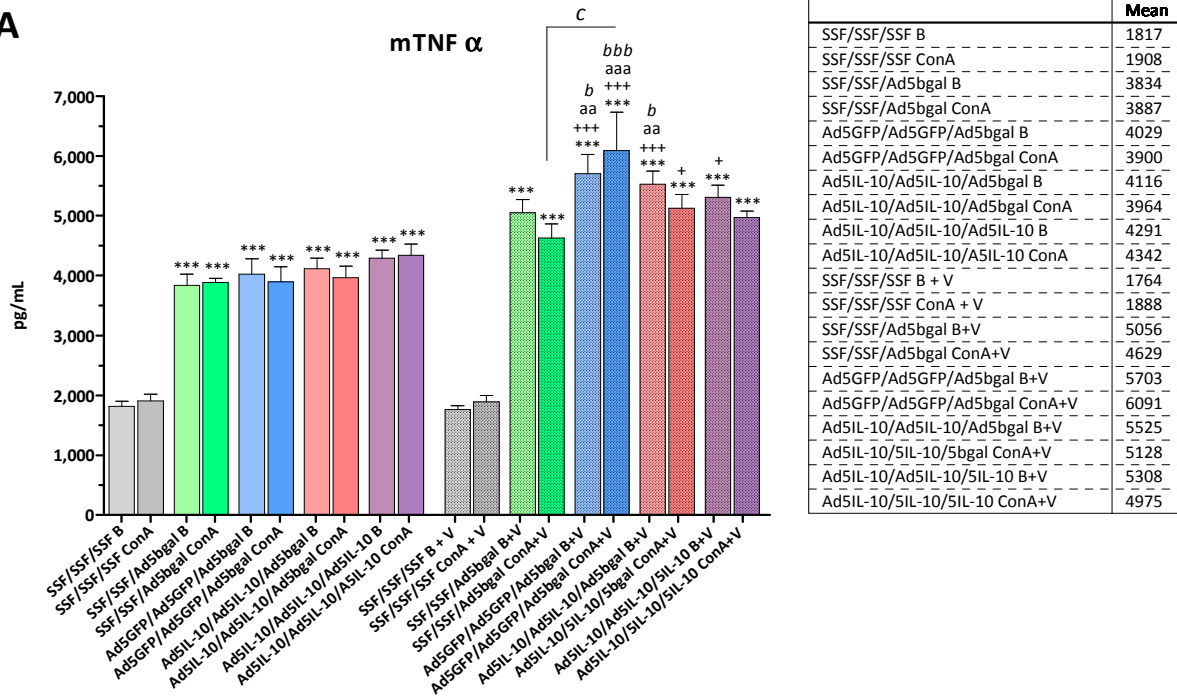


FIGURE 8: IFN- γ levels obtained in splenocytes after ConA stimulation in animals pre-immunized with Ad5.

A) IFN- γ levels (pg/mL). **B)** IFN- γ levels normalized to T cell proliferation ((pg/mL)/dpm $\times 10^{-3}$). Results are expressed as mean + SEM. **B**, (blank) unstimulated condition. **V**, (virus) Ad5GFP antigenic challenge.

A



*** P<0.001, 1 Way ANOVA.

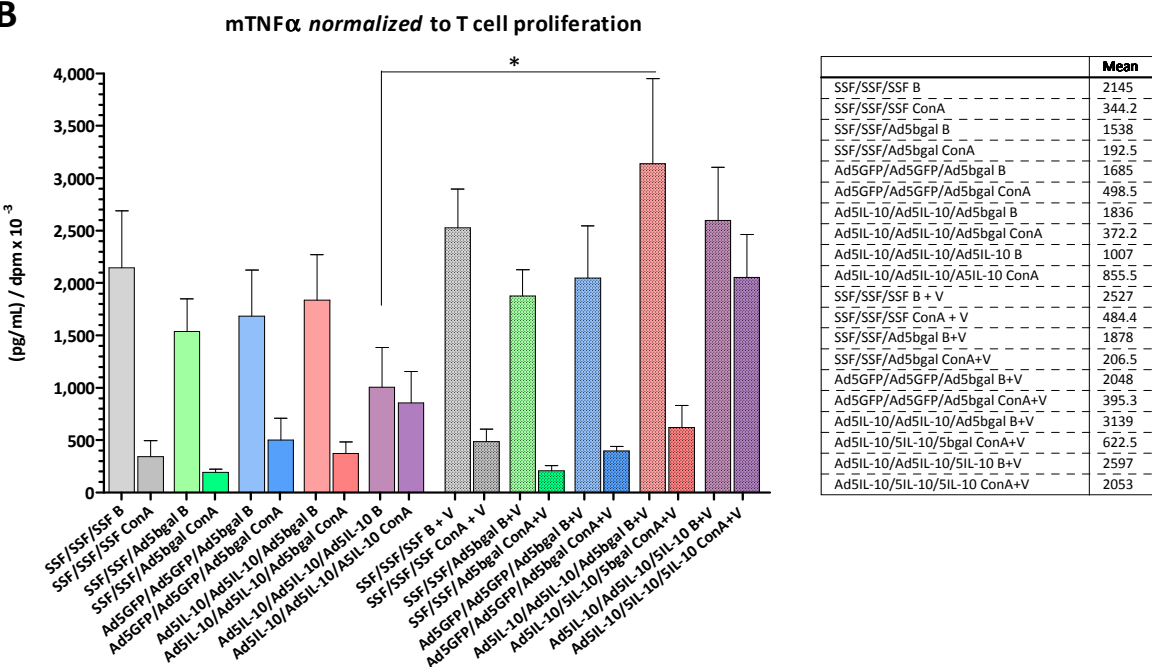
*** P<0.001 vs. SSF/SSF/SSF B and B+V, SSF/SSF/SSF/ ConA and ConA+V.

+++ P<0.001, + P<0.05 vs. SSF/SSF/Ad5βgal B and ConA, Ad5GFP/Ad5GFP/Ad5 βgal B and ConA, Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5 βgal B and ConA.

aaa P<0.001, aa P<0.01 vs. Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5 βgal B and ConA. bbb P<0.001, b P<0.05 vs. Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5IL-10 B and ConA.

C P<0.05 Ad5GFP/Ad5GFP/Ad5 βgal ConA+V vs. SSF/SSF/Ad5 βgal ConA+V. (Bonferroni's post-test).

B



*** P<0.001, 1 Way ANOVA.

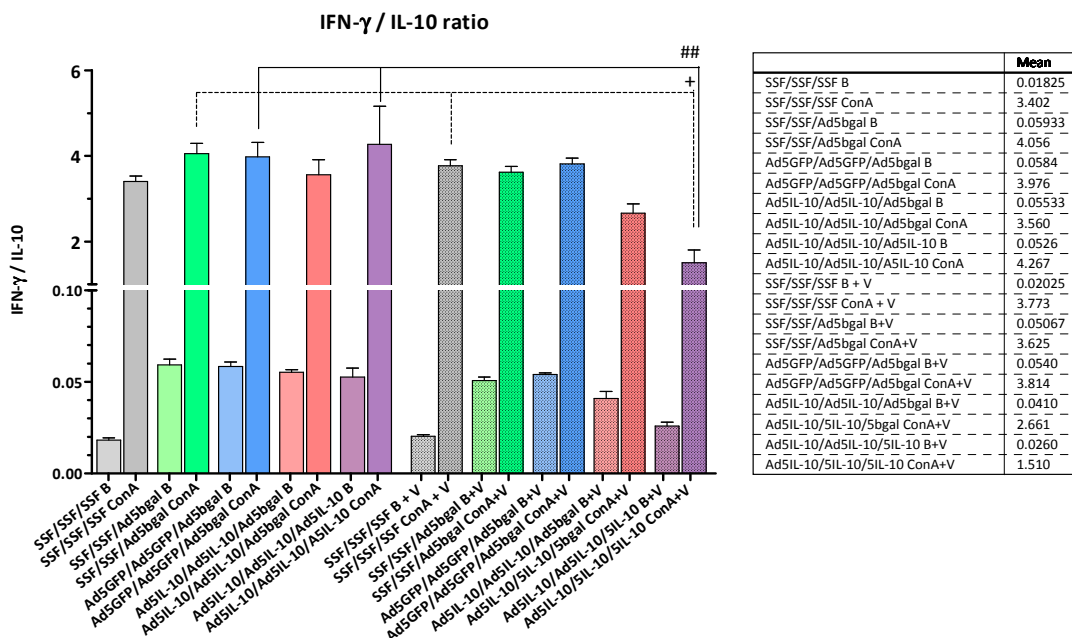
* P<0.05 Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5 βgal B+V vs. Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5IL-10 B.

(Bonferroni's Multiple Comparison Test).

FIGURE 9: TNFα levels obtained in splenocytes after ConA stimulation in animals pre-immunized with Ad5.

A) TNFα levels (pg/mL). **B)** TNFα levels normalized to T cell proliferation ((pg/mL)/dpm x 10⁻³). Results are expressed as mean + SEM. **B**, (blank) unstimulated condition. **V**, (virus) Ad5GFP antigenic challenge.

The IFN- γ /IL-10 ratio was lowest in mice receiving three injections of Ad5IL-10, particularly after exposure to the antigen (**figure 10**); these values were lower than those found in all other experimental groups, including controls not exposed to any Ad. Thus, in the triple Ad5IL-10 group the T_H2 response was enhanced. Once again, a dose-related effect of this cytokine was noticed (*i.e.*, triple versus double Ad5IL-10 administered mice).



***P<0.001, 1 Way ANOVA.

+ P<0.05 vs. SSF/SSF/Ad5 β gal ConA. and SSF/SSF/SSF ConA+V.

P<0.01 vs. Ad5GFP/Ad5GFP/Ad5 β gal ConA and Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5IL-10 ConA. (Bonferroni's post-test).

FIGURE 10: IFN- γ /IL-10 ratio.

Results are expressed as the IFN- γ /IL-10 ratio for each experimental group (mean + SEM). B, (blank) unstimulated condition. V, (virus) Ad5GFP antigenic challenge.

The levels of IgG₁ and IgG_{2a} tended to increased in mice receiving two or three injections of Ad5IL-10 when compared to the rest of experimental groups (**figures 11 and 12**). For IgG₁ this increase might suggest an IL-10 dose related B cell stimulation (*i.e.*, IgG₁ levels were higher in triple versus double Ad5IL-10 administered mice). On the contrary, IgG_{2a} levels were similar in both double and triple Ad5IL-10 administered mice. In the double Ad5IL-10 group the values were two fold higher than those found for the triple Ad5IL-10 group (mean IgG_{2a} of 30.80 and 14.21 in the double and triple Ad5IL-10 administered mice, respectively, after LPS stimulation and challenge with the antigen). These results were again suggestive of a T_H2 dominance and a T_H1 suppression by triple Ad5IL-10 injection. The IgG_{2a}/IgG₁ ratios provided a similar picture (**figure 13**).

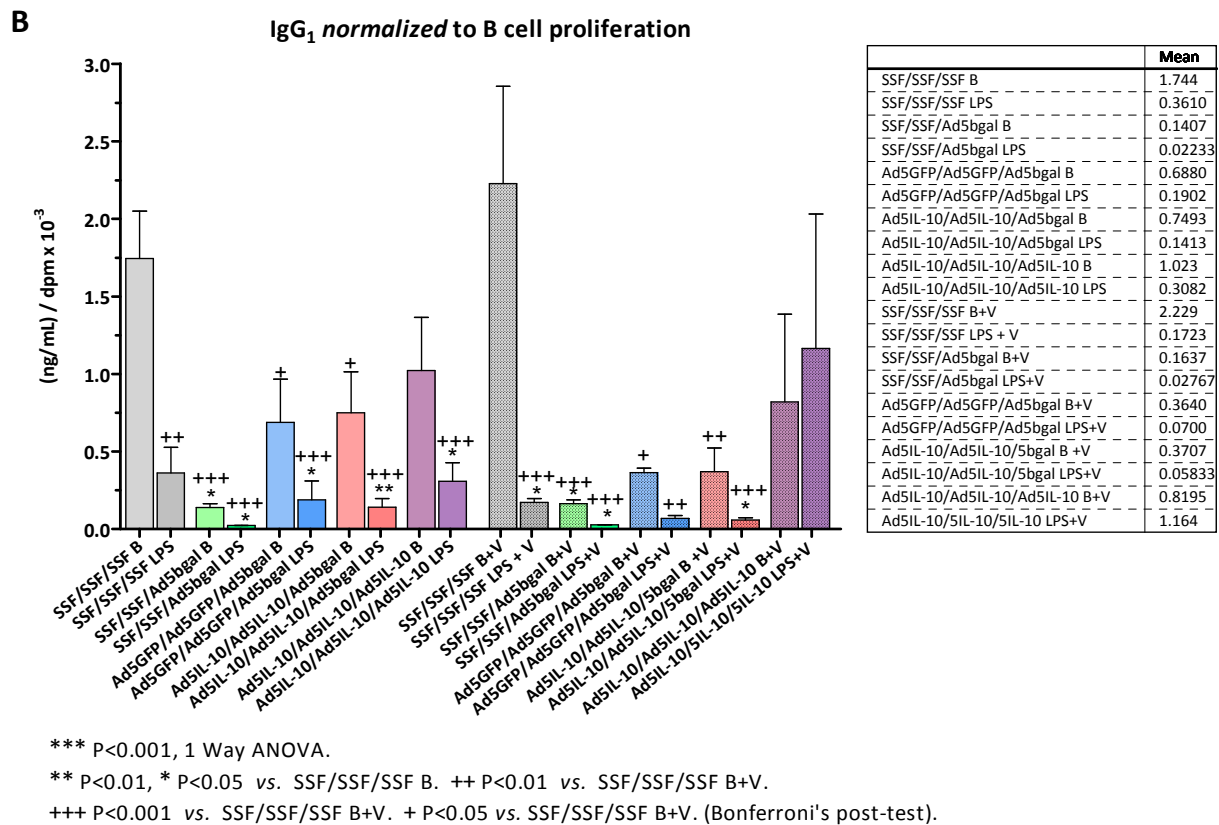
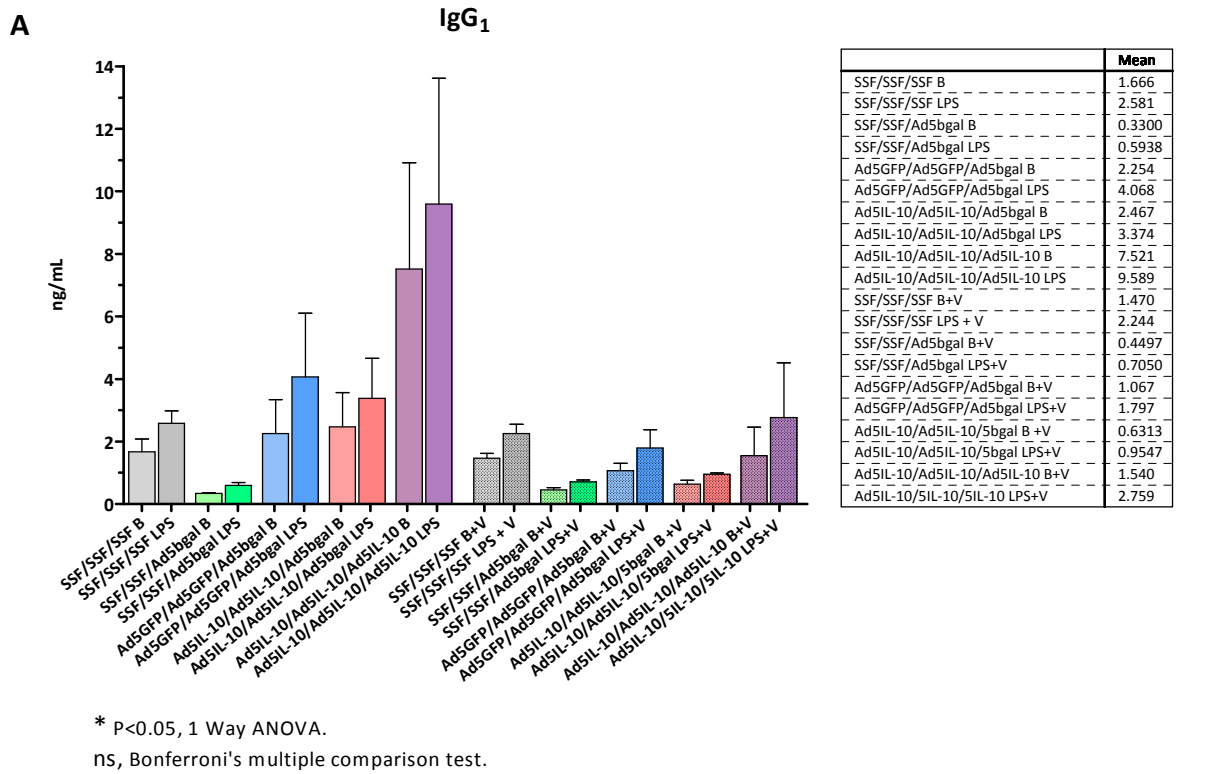


FIGURE 11: IgG₁ levels obtained in splenocytes after LPS stimulation in animals pre-immunized with Ad5.

A) IgG₁ levels (ng/mL). **B)** IgG₁ levels *normalized* to B cell proliferation ((ng/mL) / dpm x 10⁻³). Results are expressed as mean + SEM. **B**, (blank) unstimulated condition. **V**, (virus) Ad5GFP antigenic challenge.

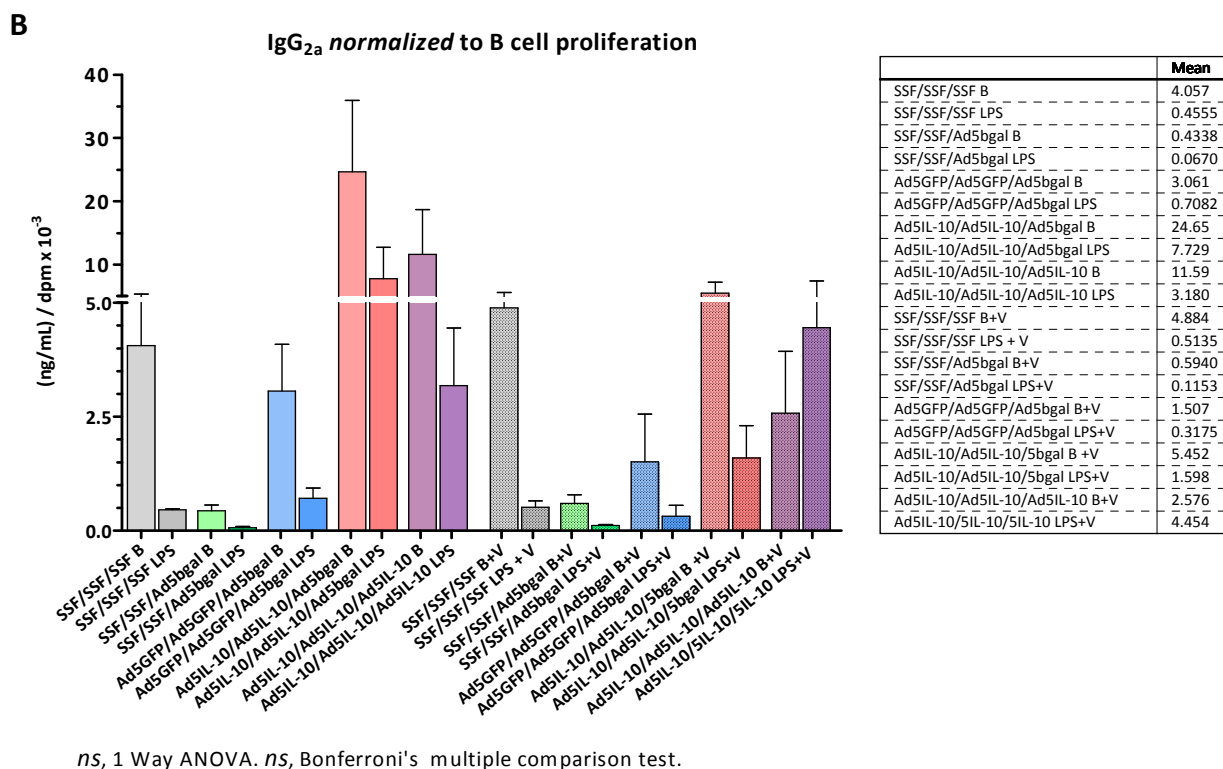
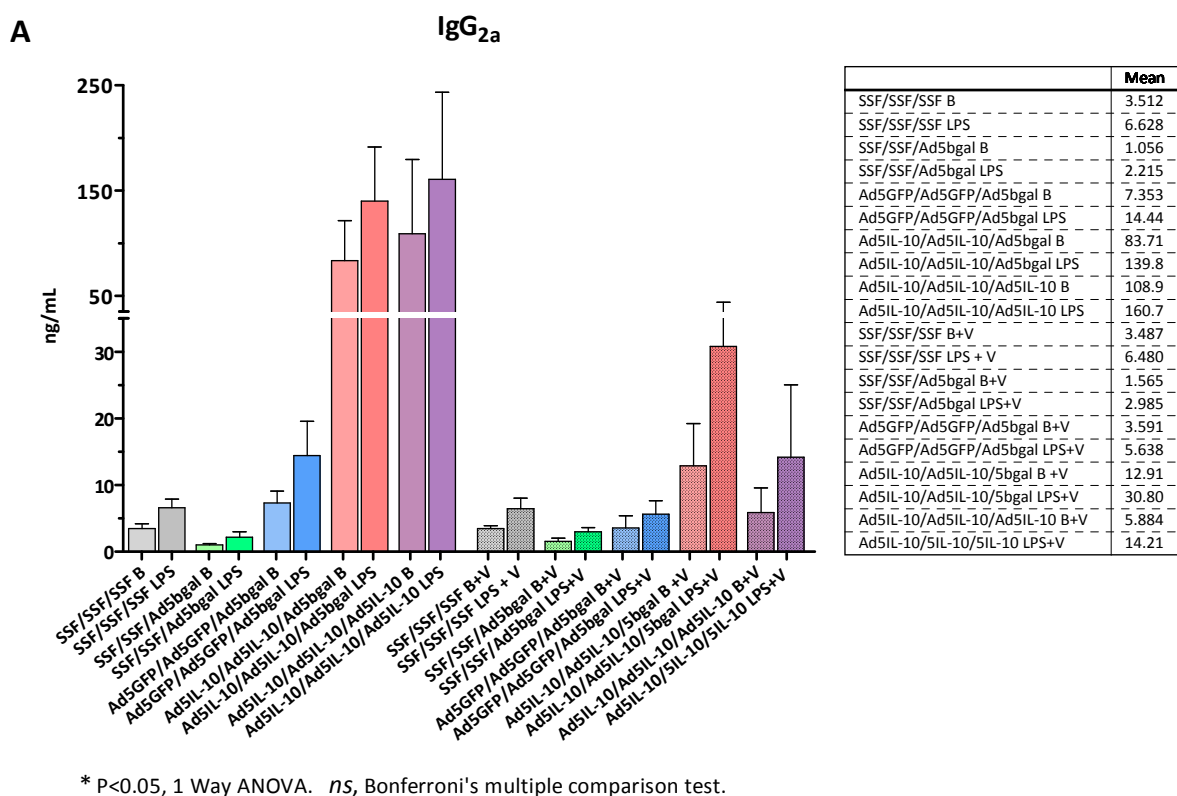


FIGURE 12: IgG_{2a} levels obtained in splenocytes after LPS stimulation in animals pre-immunized with Ad5.

A) IgG_{2a} levels (ng/mL). **B)** IgG_{2a} levels normalized to B cell proliferation ((ng/mL) / dpm x 10⁻³). Results are expressed as mean + SEM. **B**, (blank) unstimulated condition. **V**, (virus) Ad5GFP antigenic challenge.

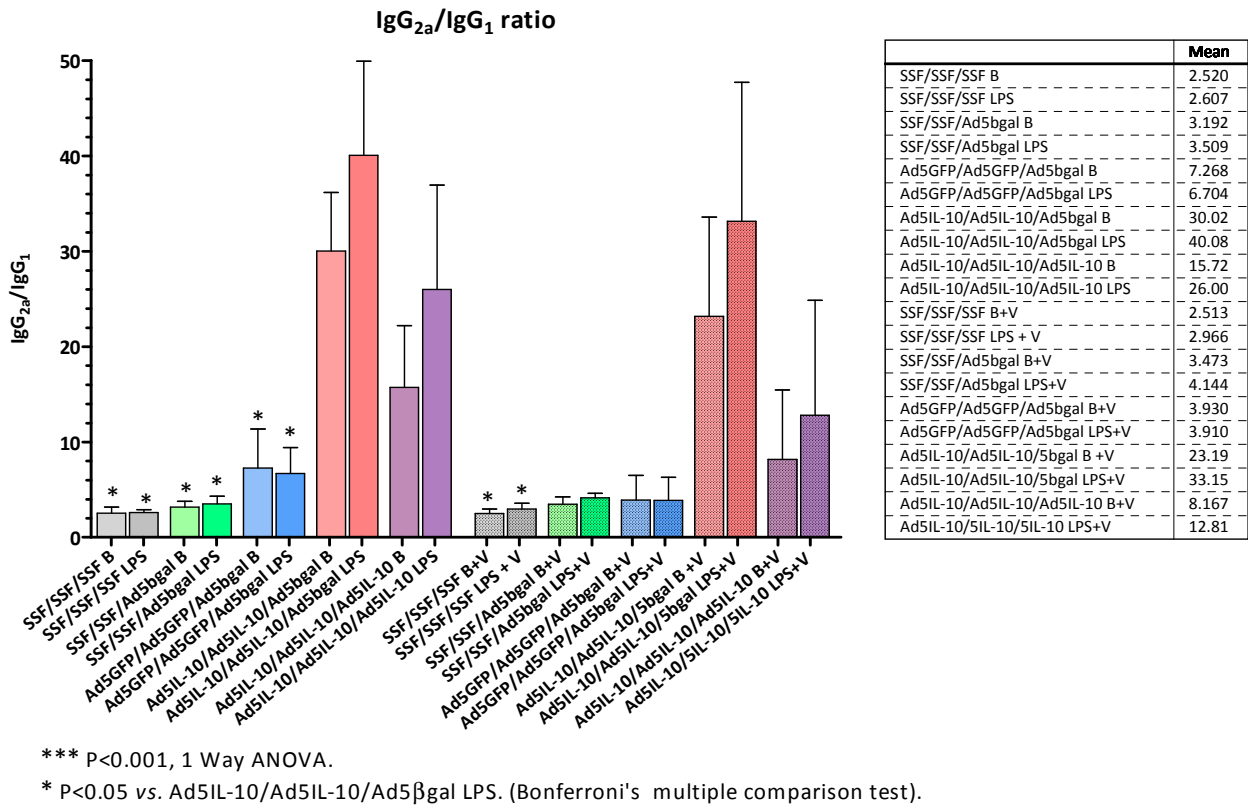


FIGURE 13: IgG_{2a}/IgG₁ ratio.

Results are expressed as the IgG_{2a}/IgG₁ (T_H1/T_H2) ratio for each experimental group (mean + SEM). **B**, (blank) unstimulated condition. **V**, (virus) Ad5GFP antigenic challenge.

GROUP	Stimulus	IL-10 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IFN- γ (pg/mL)	TNF α (pg/mL)	Stimulus	IgG ₁ (ng/mL)	IgG _{2a} (ng/mL)
SSF / SSF / SSF	None	1456 \pm 27.94	1.93 \pm 0.13	26.58 \pm 1.41	1817 \pm 84.23	None	1.66 \pm 0.41	3.51 \pm 0.71
SSF / SSF / SSF	ConA	1530 \pm 55.02	21.91 \pm 0.97	5193 \pm 179	1908 \pm 113.9	LPS	2.58 \pm 0.4	6.63 \pm 1.30
SSF / SSF / Ad5 β -gal	None	1280 \pm 80.29	1.71 \pm 0.03	75.58 \pm 1.67	3834 \pm 192.8	None	0.33 \pm 0.03	1.05 \pm 0.21
SSF / SSF / Ad5 β -gal	ConA	1309 \pm 54.85	18.17 \pm 0.76	5285 \pm 121	3887 \pm 69.35	LPS	0.59 \pm 0.09	2.21 \pm 0.80
Ad5GFP / Ad5GFP / Ad5 β -gal	None	1382 \pm 41.59	1.83 \pm 0.06	80.4 \pm 1.132	4029 \pm 252.2	None	2.25 \pm 1.08	7.35 \pm 1.76
Ad5GFP / Ad5GFP / Ad5 β -gal	ConA	1453 \pm 38.06	18.4 \pm 1.08	5745 \pm 404	3900 \pm 247.6	LPS	4.07 \pm 2.03	14.44 \pm 5.10
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5 β -gal	None	1462 \pm 49.19	1.81 \pm 0.07	80.44 \pm 1.04	4116 \pm 176.5	None	2.47 \pm 1.09	83.71 \pm 37.8
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5 β -gal	ConA	1506 \pm 81.40	23.51 \pm 2.87	5231 \pm 340.5	3964 \pm 191.8	LPS	3.37 \pm 1.28	139.8 \pm 51.40
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5IL-10	None	1589 \pm 170.6	2.03 \pm 0.22	80.6 \pm 1.45	4291 \pm 133.8	None	7.52 \pm 3.4	108.9 \pm 70.60
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5IL-10	ConA	1873 \pm 341.3	21.2 \pm 1.43	6857 \pm 770	4342 \pm 188.6	LPS	9.59 \pm 4.02	160.7 \pm 82.80
SSF / SSF / SSF	None + Ag	1283 \pm 18.45	2.41 \pm 0.20	25.92 \pm 1.29	1764 \pm 67.44	None + Ag	1.47 \pm 0.15	3.48 \pm 0.44
SSF / SSF / SSF	ConA + Ag	1417 \pm 54.25	20.24 \pm 0.19	5341 \pm 246.1	1888 \pm 110.4	LPS + Ag	2.24 \pm 0.31	6.48 \pm 1.59
SSF / SSF / Ad5 β -gal	None + Ag	1613 \pm 33.94	1.78 \pm 0.05	81.71 \pm 2.15	5056 \pm 216.7	None + Ag	0.45 \pm 0.07	1.56 \pm 0.47
SSF / SSF / Ad5 β -gal	ConA + Ag	1440 \pm 65.41	17.62 \pm 0.61	5205 \pm 98.21	4629 \pm 237.0	LPS + Ag	0.70 \pm 0.06	2.98 \pm 0.64
Ad5GFP / Ad5GFP / Ad5 β -gal	None + Ag	1592 \pm 15.84	2.02 \pm 0.06	86.04 \pm 0.56	5703 \pm 321.9	None + Ag	1.07 \pm 0.23	3.59 \pm 1.80
Ad5GFP / Ad5GFP / Ad5 β -gal	ConA + Ag	1543 \pm 7.085	18.31 \pm 3.07	5885 \pm 233.3	6091 \pm 644.8	LPS + Ag	1.79 \pm 0.58	5.64 \pm 2.00
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5 β -gal	None + Ag	1888 \pm 122.2	2.173 \pm 0.04	76.77 \pm 2.03	5525 \pm 224.3	None + Ag	0.63 \pm 0.12	12.91 \pm 6.33
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5 β -gal	ConA + Ag	1695 \pm 162.8	17.84 \pm 0.78	4439 \pm 68.38	5128 \pm 225.3	LPS + Ag	0.95 \pm 0.03	30.8 \pm 13.16
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5IL-10	None + Ag	3254 \pm 181.3	2.06 \pm 0.11	83.94 \pm 0.60	5308 \pm 203.5	None + Ag	1.54 \pm 0.92	5.88 \pm 3.71
Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5IL-10	ConA + Ag	3668 \pm 237.1	20.96 \pm 2.16	5470 \pm 714.7	4975 \pm 103.5	LPS + Ag	2.76 \pm 1.75	14.21 \pm 10.8

TABLE 3: Splenocyte cytokine and immunoglobulin releasing capacities.

Highest levels for each cytokine/immunoglobuline are highlighted in yellow.

DISCUSSION

One of the most important shortcomings of gene therapy with adenoviral vectors is to overcome the host immune response and to warrant the efficacy of subsequent readministrations. Previous studies in rodents have shown that memory-type immune responses may substantially diminish the efficacy of gene transfer following a second administration of the vector [26, 38]. The immune response raised by the host can be directed towards vector capsid proteins or towards the transgene, can exhibit a predominantly T_H1 or T_H2 profile and rely mostly on humoral or on cellular responses.

Interleukin-10 is a powerful pleiotropic cytokine exerting both immunostimulatory and immunosuppressive or anti-inflammatory actions depending on the target cell and the experimental model of disease [39]. This cytokine can suppress the release of proinflammatory cytokines such as IFN- γ and TNF α . It can also down-regulate the antigen presenting and effector functions of macrophages and attenuate T_H1 T cell-mediated immune responses [39-41]. IL-10 has also been recognised as a strong differentiating factor for activated B cells [42] increasing their secretion of immunoglobulins. It is thus important to study the outcome of repeated administrations of Ad5IL-10 in terms of cellular and humoral immune responses and T_H1/T_H2 profiling since the regulatory effects of IL-10 can result in significant changes in the response mounted by the host.

Qin et al. have demonstrated that viral IL-10 (vIL-10) was responsible for the inhibition of the cytotoxic immune response generated to both alloantigen and adenoviral antigens [35]. They also showed that vIL-10 was able to decrease IFN- γ production in spleen culture supernatants, whereas IL-2, IL-4 and IL-10 remained at low levels and unchanged. Ad-specific proliferative T cell responses *in vitro* were unaltered as well after Ad5vIL-10 administration. So, they conclude that the efficacy of adenoviral vector can be improved by incorporation of IL-10-like molecules.

We have studied the splenocyte proliferative and secretory responses in mice treated with either a single or a triple injection of an Ad5 encoding non-immunoregulatory genes, and compared them to those exhibited by spleen cells taken from mice treated with either three injections of Ad5IL-10 or two injections of Ad5IL-10 followed by a single administration of Ad5 encoding a non-immunoregulatory gene (*see materials and methods for further details*). Regarding lymphoproliferative responses (*figure 1*), we have found that spleen cells of animals treated with two or three injections of Ad5IL-10 exhibited lower proliferation compared to animals treated with one to three injections of Ad encoding non-immunoregulatory genes. This is particularly obvious for T cell proliferation which was nearly abrogated in the triple Ad5IL-10 group. Spleen cells taken from animals treated with two injections of Ad5IL-10 and receiving a final challenge with Ad5 β -gal (*i.e.*, Ad5IL-10/Ad5IL-10/Ad5 β -gal) exhibited proliferative responses similar to those of splenocytes

taken from naïve animals (SSF/SSF/SSF) under the same type of *in vitro* stimulation. These results are in agreement with data reported by *de Waal Malefyt et al. [40]* who demonstrated reduced Ag-specific T cell proliferation by either mIL-10 or vIL-10 after restimulation of the cells with the same Ag. The inhibitory effects on T cell proliferation were associated with the inhibition of the APC capacity in monocytes through down-regulation of MHC II expression on these cells. Of note, the proliferation shown by splenocytes of animals treated with a single Ad5 β -gal injection (*i.e.*, SSF/SSF/Ad5 β -gal) was higher than that found for splenocytes corresponding to the group receiving two injections of Ad5GFP and a final challenge with Ad5 β -gal (*i.e.*, Ad5GFP/Ad5GFP/Ad5 β -gal). Although both GFP and β -gal are non-immunoregulatory proteins, it has been reported that β -gal is much more immunogenic than GFP [23, 43]. The decreased proliferation observed for animals receiving Ad5GFP/Ad5GFP/Ad5 β -gal compared to that of the single Ad5 β -gal injection suggests that this last vector causes a maximal response whereas Ad5GFP may to some extent induce a certain tolerization.

The reported reduction in proliferation in the group treated with three injections of Ad5IL-10 is not dependent on the expression of the transgene by the splenocytes since previous studies have shown that the extent of spleen transduction is very low even after intravenous administration of Ad5 (*see chapter 3 and [44]*). This effect rather reflects the long term outcome of the high IL-10 levels produced by transduced hepatocytes and released to circulation in the days that follow each administration.

Of note, the effects on B cell proliferation are milder compared to those found for T cells. Two of the reported effects of IL-10 may influence this variable: in one hand, IL-10 has shown to decrease macrophage antigen presentation efficiency. In the other hand, IL-10 has been reported to promote proliferation of activated B cells [39, 45, 46]. The balance of the two effects probably yields the very modest increase in B cell proliferation that we found for spleen cells of mice treated with three injections of Ad5IL-10, which was further reduced upon exposure to the antigen, supporting the concept that there is a general immunomodulation and a specific tolerization towards viral antigens. In agreement with this concept, the B cell proliferation corresponding to the group of mice receiving two injections of Ad5IL-10 is indeed quite similar to that found for splenocytes from naïve mice and lower than that found for B cells from mice treated with one or three injections of Ad5 encoding non-immunoregulatory genes.

Immune responses induced by Ad vector administration to naïve animals depends on the dose and the route of administration but are also related to vector design and to the nature of the transgene employed [23]. Finally, host species and strain [15, 23, 25] as well as its immunologic status [23] or the existence of a cytokine-rich environment in the target tissue [15] are also factors of major importance. *Van Ginkel et al. [22]* demonstrated that different and specific systemic immune responses are generated towards the Ad and

towards the transgene after Ad5 intratracheal administration. This study provided direct evidence for the concomitant induction of T_H1 and T_H2 (mostly) anti-Ad5 responses (Ad5 elicited increased serum IgG₁ and lower IgG_{2a} levels) while predominant T_H1 responses to the transgene were elicited (the β -gal transgene increased IgG_{2a} and decreased IgG₁). Furthermore anti-Ad5 T CD4⁺ splenocytes produced increased amounts of IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5 and IL-6, whereas anti- β gal T CD4⁺ splenocytes produced IFN- γ and IL-6.

This is important since our data evidenced the dominant increase of IgG_{2a} over IgG₁ and the predominant total levels of the T_H1 cytokines IFN- γ and TNF α after Ad5 readministrations. This generally increased T_H1 phenotype was however attenuated by the concomitant IL-10 administration (*i.e.*, double or triple Ad5IL-10 administrations) showing the highest levels of IL-10, IL-4 and IgG₁ (*i.e.*, T_H2 phenotype) among all experimental groups. The discrepancies between our results and those of *van Ginkel et al.* are likely related to the route of administration, the dose and the vector design (E1- and E3-deleted Ad5 in their study).

In the present study, normalized levels of IL-4 secreted by T cells of animals treated with three injections of Ad5IL-10 were markedly increased, particularly upon exposure to the antigen (*figure 7B*). This cytokine (IL-4) is known to promote differentiation of macrophages to a M2 polarised population ('repair phenotype'), enhancing the T_H2 profile, the secretion of IL-10 and the proliferation of B cells [46-49]. Furthermore, these animals actually exhibited the lowest IFN- γ /IL-10 ratio, particularly after exposure to the Ag (Ad5GFP) *in vitro* confirming a T_H2 bias in the anti-adenoviral cellular response.

It is important to mention that in our study the final *in vitro* splenocyte challenge was performed with Ad5GFP; the first injections to animals consisted of either Ad5GFP or Ad5IL-10. Ad5 β -gal was given only in the last injection (3 days before endpoint). Thus, only capsid proteins might eventually cause the antigen-induced release of cytokines and IgGs. Our results show that the release of ELISA-detected IgGs in such groups is small (*figures 11 and 12*). Instead, spleen cells from animals treated with two or three injections of Ad5IL-10 release larger amounts of IgGs, in agreement with the reported stimulatory effect of IL-10 on B cells [39, 45].

Our results show that IFN- γ levels were significantly increased in the triple Ad5IL-10 group when compared to all other experimental groups (*Figure 8B*). IFN- γ is known to inhibit the proliferation of T_H2 cells which in turn are thought to be the primary subset involved in the formation of antibodies [48]. This may also contribute to the low anti-AdNAb titer found within this group (*figure 5 and table 2*).

Likewise, we have demonstrated the reduction of Ag-specific TNF α release after restimulation in the triple Ad5IL-10 group when compared to Ad5GFP/Ad5GFP/Ad5 β -gal mice (*figure 9A*). These results are in agreement with previous observations showing

suppressed TNF α production by T_H1 cells in response to mIL-10 in mice [50-52] and rhIL-10 in humans with IBD [53].

Previous studies [54] suggested that the titers of anti-Ad IgGs raised in rats receiving a single systemic injection of either Ad5 β -gal or Ad5IL-10 are similar (of T_H1-dependent IgG_{2a} subclass). As stated before, other studies [22] have shown that the response elicited by the transgene was mainly T_H1 (increased anti β -gal IgG_{2a} and decreased anti β -gal IgG₁), whereas viral proteins induced a predominant IgG₁ secretion (T_H2 subclass). Animals treated with low single intravenous doses of Ad5IL-4 (25% of the Ad5IL-10 and Ad5 β -gal vector doses given in the same study) exhibited higher titers of T_H2 IgGs, more pronounced hepatic leukocyte infiltration and other deleterious effects than animals treated with Ad5IL-10 or Ad5 β -gal [54]. Total anti-Ad IgGs (*i.e.*, ELISA-detected) were similarly increased after Ad5IL-10 or Ad5IL-4 intravenous administration. However, only after Ad5IL-4 injection high anti-AdNabs titers were detected. It was thus concluded that Ad5IL-4, but not Ad5IL-10, enhances both cellular and humoral anti-Ad responses in rats. These results are in agreement with our data, which demonstrate low anti-AdNabs titers but increased ELISA-detected IgGs after systemic Ad5IL-10 administration.

In the present study we show that animals receiving several injections of Ad5 encoding IL-10 have an increased ability to secrete IgG₁ and IgG_{2a} (*figures 11 and 12*), according to the described stimulatory effect of IL-10 on activated B cells [39, 45]. The release of IgGs induced by challenging spleen cells with the antigen (Ad5GFP) was lower than that induced by unspecific stimulation (LPS), in agreement with the reported IL-10-induced decrease of the antigen presentation ability of macrophages [45, 46]. Regarding the relative T_H1/T_H2 bias, it is often difficult to discriminate in scenarios in which strong proliferative responses are going on. Since the IgG_{2a}/IgG₁ ratio (*figure 13*) was higher in mice receiving two injections of Ad5IL-10 in comparison with those receiving three injections of this vector, and since the proliferation induced by the two regimes was markedly different (*figure 1*), we recalculated the relative IgG subclass secretion considering the actual number of cells in each situation. Consistent with previous results [19] total IgG_{2a} levels were increased *versus* those of IgG₁ in all groups. IgG₁ and IgG_{2a} levels were found increased in the double and triple Ad5IL-10 treated mice, in an apparent dose-dependent manner, but only prior the final Ag challenge, which caused a decrease in the secretion of both immunoglobulins to merely baseline values (*figures 11 and 12*).

Our results are partially in agreement with data of *Minter et al.* [55] demonstrating a significant reduction of Ab titers to both the vector and the transgene (huIL-10) after direct adenoviral delivery to mice lung. This recombinant Ad encoding the IL-10 gene of human origin was well tolerated, exhibited prolonged expression compared with Ad5 β -gal, and was non-immunogenic in the murine lung. In this study total anti-AdNabs titers after instillation of AdhuIL-10 were much lower than those obtained after instillation of Ad5 β -gal. However,

the differences between the study of Minter and the results obtained by A. David and ourselves may be due to the different route of administration (intratraqueal *versus* systemic) and the use of an heterologous *versus* autologous transgene.

The first challenge with a wild type Ad generates a systemic B cell response mainly consisting of species-specific anti-Ad antibodies in serum. These antibodies generally decline to undetectable levels if reinfection does not occur [56]. In humans, most healthy adults (>70%) have anti-AdNAbs against several of the most frequent Ad serotypes (species C Ad5 and Ad2) from naturally occurring infections [56-58]. Among these Abs, isotype IgG₁ has been mostly implicated in response to intravenously administered Ad vectors [59].

Systemic anti-AdNAb response has been extensively evaluated in clinical trials of cystic fibrosis after instillation of E1-deleted Ad5 vectors directly to the respiratory epithelium [56, 57]. These studies demonstrate that this response is minimal when compared to other routes of administration [60, 61]. Again, the route of administration seems to play a fundamental role in the systemic anti-AdNAb response to first generation Ad5 vectors [55, 56].

Humans, unlike experimental animals [19, 22, 23, 26, 31, 32, 38, 43, 62-66], do not seem to invariably produce a systemic anti-Ad neutralizing response upon repeated adenoviral vector administration. Although pre-existing anti-AdNAbs should in principle reduce transgene expression, clinical trials have shown that infection by Ad vectors results in measurable transgene expression even in the presence of serum anti-AdNAbs [61]. This has prompted to hypothesize a role for soluble serum components as putative mediators of viral infection. For instance, several coagulation factors (IX and X) [67, 68] as well as the complement receptor 1 (C1q) and complement component C4-binding protein (C4-BP) seem to enhance adenoviral infectivity and transduction capacity [69, 70] in the presence of anti-hexon and anti-fiber NAbs, but independently on CAR expression [71]. Thus, since certain serum factors may enhance Ad infectivity, and in order to prevent underestimation of the presence of anti-AdNAbs in sera, we routinely decomplexed all serum samples before using them to detect the putative presence of these neutralizing antibodies [71].

All assays were performed in A549 cells which are highly permissive to adenoviral infection but do not enable replication of E1-deleted adenoviral vectors. This cell line has been thus recommended as standard cell line for the anti-Ad neutralization assay [72]. Our results have shown that the anti-AdNAb titers increase with increasing number of adenoviral injections (single *versus* multiple Ad5GFP injections) whereas the levels found whenever Ad5IL-10 has been injected to mice are lower and similar to those obtained after a single Ad5 injection (table 2).

In conclusion, our results show that repeated Ad5IL-10 administrations in healthy mice are well tolerated and induce a relatively mild immune response which appears to be due to the immunomodulatory effect of the vector-borne IL-10 overexpression. Cellular and

humoral host immune responses are markedly reduced after Ad5IL-10 readministrations, as shown by the reduced antigen-specific T and B cell proliferative responses. In addition, a marked T_H1 suppression, as well as a T_H2 enhancement, is observed, and the titer of anti-AdNAb's found in serum following repeated injections of the vector is relatively low. These results suggest that Ad5IL-10 vector might be successful when used in multiple administration protocols.

REFERENCES

1. Hartman ZC, Appledorn DM, Amalfitano A. Adenovirus vector induced innate immune responses: impact upon efficacy and toxicity in gene therapy and vaccine applications. *Virus Res* 2008;132:1-14.
2. Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 2001;7:33-40.
3. Nayak S, Herzog RW. Progress and prospects: immune responses to viral vectors. *Gene Ther* 2010;17:295-304.
4. Liu Q, Muruve DA. Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors. *Gene Ther* 2003;10:935-40.
5. Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gonczol E, Wilson JM. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4407-11.
6. Yang Y, Ertl HC, Wilson JM. MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses. *Immunity* 1994;1:433-42.
7. Muruve DA. The innate immune response to adenovirus vectors. *Hum Gene Ther* 2004;15:1157-66.
8. Einfeld DA, Schroeder R, Roelvink PW, et al. Reducing the native tropism of adenovirus vectors requires removal of both CAR and integrin interactions. *J Virol* 2001;75:11284-91.
9. Vrancken Peeters MJ, Perkins AL, Kay MA. Method for multiple portal vein infusions in mice: quantitation of adenovirus-mediated hepatic gene transfer. *Biotechniques* 1996;20:278-85.
10. Appledorn DM, Patial S, McBride A, et al. Adenovirus vector-induced innate inflammatory mediators, MAPK signaling, as well as adaptive immune responses are dependent upon both TLR2 and TLR9 in vivo. *J Immunol* 2008;181:2134-44.
11. Lieber A, He CY, Meuse L, et al. The role of Kupffer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after infusion of recombinant adenovirus vectors. *J Virol* 1997;71:8798-807.
12. Worgall S, Wolff G, Falck-Pedersen E, Crystal RG. Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration. *Hum Gene Ther* 1997;8:37-44.
13. Coutelier JP, Van BJ, Wolf SF. Interleukin-12 gene expression after viral infection in the mouse. *J Virol* 1995;69:1955-8.
14. Muruve DA, Barnes MJ, Stillman IE, Libermann TA. Adenoviral gene therapy leads to rapid induction of multiple chemokines and acute neutrophil-dependent hepatic injury in vivo. *Hum Gene Ther* 1999;10:965-76.
15. Sung RS, Qin L, Bromberg JS. TNFalpha and IFNgamma induced by innate anti-adenoviral immune responses inhibit adenovirus-mediated transgene expression. *Mol Ther* 2001;3:757-67.
16. Gangappa S, Babu JS, Thomas J, Daheshia M, Rouse BT. Virus-induced immunoinflammatory lesions in the absence of viral antigen recognition. *J Immunol* 1998;161:4289-300.
17. Otake K, Ennist DL, Harrod K, Trapnell BC. Nonspecific inflammation inhibits adenovirus-mediated pulmonary gene transfer and expression independent of specific acquired immune responses. *Hum Gene Ther* 1998;9:2207-22.
18. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.
19. Gahery-Segard H, Juillard V, Gaston J, et al. Humoral immune response to the capsid components of recombinant adenoviruses: routes of immunization modulate virus-induced Ig subclass shifts. *Eur J Immunol* 1997;27:653-9.
20. Huard J, Lochmuller H, Acsadi G, et al. Differential short-term transduction efficiency of adult versus newborn mouse tissues by adenoviral recombinants. *Exp Mol Pathol* 1995;62:131-43.
21. Smith TA, White BD, Gardner JM, Kaleko M, McClelland A. Transient immunosuppression permits successful repetitive intravenous administration of an adenovirus vector. *Gene Ther* 1996;3:496-502.
22. Van Ginkel FW, McGhee JR, Liu C, et al. Adenoviral gene delivery elicits distinct pulmonary-associated T helper cell responses

- to the vector and to its transgene. *J Immunol* 1997;159:685-93.
23. Michou AI, Santoro L, Christ M, Julliard V, Pavirani A, Mehtali M. Adenovirus-mediated gene transfer: influence of transgene, mouse strain and type of immune response on persistence of transgene expression. *Gene Ther* 1997;4:473-82.
 24. Morral N, O'Neal WK, Rice K, et al. Lethal toxicity, severe endothelial injury, and a threshold effect with high doses of an adenoviral vector in baboons. *Hum Gene Ther* 2002;13:143-54.
 25. Schowalter DB, Himeda CL, Winther BL, Wilson CB, Kay MA. Implication of interfering antibody formation and apoptosis as two different mechanisms leading to variable duration of adenovirus-mediated transgene expression in immune-competent mice. *J Virol* 1999;73:4755-66.
 26. Yang Y, Li Q, Ertl HC, Wilson JM. Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *J Virol* 1995;69:2004-15.
 27. Gahery-Segard H, Farace F, Godfrin D, et al. Immune response to recombinant capsid proteins of adenovirus in humans: antifiber and anti-penton base antibodies have a synergistic effect on neutralizing activity. *J Virol* 1998;72:2388-97.
 28. Sarkioja M, Pesonen S, Raki M, et al. Changing the adenovirus fiber for retaining gene delivery efficacy in the presence of neutralizing antibodies. *Gene Ther* 2008;15:921-9.
 29. Bangari DS, Mittal SK. Current strategies and future directions for eluding adenoviral vector immunity. *Curr Gene Ther* 2006;6:215-26.
 30. Dai Y, Schwarz EM, Gu D, Zhang WW, Sarvetnick N, Verma IM. Cellular and humoral immune responses to adenoviral vectors containing factor IX gene: tolerization of factor IX and vector antigens allows for long-term expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1401-5.
 31. Mack CA, Song WR, Carpenter H, et al. Circumvention of anti-adenovirus neutralizing immunity by administration of an adenoviral vector of an alternate serotype. *Hum Gene Ther* 1997;8:99-109.
 32. Mastrangeli A, Harvey BG, Yao J, et al. "Sero-switch" adenovirus-mediated in vivo gene transfer: circumvention of anti-adenovirus humoral immune defenses against repeat adenovirus vector administration by changing the adenovirus serotype. *Hum Gene Ther* 1996;7:79-87.
 33. Robbins PD, Ghivizzani SC. Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol Ther* 1998;80:35-47.
 34. Robbins PD, Tahara H, Ghivizzani SC. Viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol* 1998;16:35-40.
 35. Qin L, Ding Y, Pahud DR, Robson ND, Shaked A, Bromberg JS. Adenovirus-mediated gene transfer of viral interleukin-10 inhibits the immune response to both alloantigen and adenoviral antigen. *Hum Gene Ther* 1997;8:1365-74.
 36. Ye X, Robinson MB, Pabin C, Batshaw ML, Wilson JM. Transient depletion of CD4 lymphocyte improves efficacy of repeated administration of recombinant adenovirus in the ornithine transcarbamylase deficient sparse fur mouse. *Gene Ther* 2000;7:1761-7.
 37. Minguet S, Dopfer EP, Pollmer C, et al. Enhanced B-cell activation mediated by TLR4 and BCR crosstalk. *Eur J Immunol* 2008;38:2475-87.
 38. Smith TA, Mehaffey MG, Kayda DB, et al. Adenovirus mediated expression of therapeutic plasma levels of human factor IX in mice. *Nat Genet* 1993;5:397-402.
 39. Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev* 2003;55:241-69.
 40. de Waal MR, Haanen J, Spits H, et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991;174:915-24.
 41. Taga K, Tosato G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol* 1992;148:1143-8.
 42. Rousset F, Garcia E, Defrance T, et al. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:1890-3.

43. Juillard V, Villefroy P, Godfrin D, Pavirani A, Venet A, Guillet JG. Long-term humoral and cellular immunity induced by a single immunization with replication-defective adenovirus recombinant vector. *Eur J Immunol* 1995;25:3467-73.
44. Lindsay JO, Ciesielski CJ, Scheinin T, Brennan FM, Hodgson HJ. Local delivery of adenoviral vectors encoding murine interleukin 10 induces colonic interleukin 10 production and is therapeutic for murine colitis. *Gut* 2003;52:981-7.
45. Moore KW, de Waal MR, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683-765.
46. Warren J Leonard. Type I Cytokines and Interferons and their Receptors. In: Lippincott Williams and Wilkins, ed. *Fundamental Immunology*, 6 Edn 2008.
47. Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, et al. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol* 1990;8:303-33.
48. Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 1994;76:241-51.
49. Ueda T, Takeyama Y, Yasuda T, Takase K, Nishikawa J, Kuroda Y. Functional alterations of splenocytes in severe acute pancreatitis. *J Surg Res* 2002;102:161-8.
50. de Waal MR, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174:1209-20.
51. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989;170:2081-95.
52. Ralph P, Nakoinz I, Sampson-Johannes A, et al. IL-10, T lymphocyte inhibitor of human blood cell production of IL-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1992;148:808-14.
53. Tilg H, Van MC, van den EA, et al. Treatment of Crohn's disease with recombinant human interleukin 10 induces the proinflammatory cytokine interferon gamma. *Gut* 2002;50:191-5.
54. David A, Coupel-Claude H, Chetritt J, et al. Anti-adenovirus immune responses in rats are enhanced by interleukin 4 but not interleukin 10 produced by recombinant adenovirus. *Hum Gene Ther* 1998;9:1755-68.
55. Minter RM, Rectenwald JE, Fukuzuka K, et al. TNF-alpha receptor signaling and IL-10 gene therapy regulate the innate and humoral immune responses to recombinant adenovirus in the lung. *J Immunol* 2000;164:443-51.
56. Harvey BG, Hackett NR, El-Sawy T, et al. Variability of human systemic humoral immune responses to adenovirus gene transfer vectors administered to different organs. *J Virol* 1999;73:6729-42.
57. Chirmule N, Probert K, Magosin S, Qian Y, Qian R, Wilson J. Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther* 1999;6:1574-83.
58. Schmitz H, Wigand R, Heinrich W. Worldwide epidemiology of human adenovirus infections. *Am J Epidemiol* 1983;117:455-66.
59. Benihoud K, Saggio I, Opolon P, et al. Efficient, repeated adenovirus-mediated gene transfer in mice lacking both tumor necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha. *J Virol* 1998;72:9514-25.
60. Couch RB, Kasel JA, Perreira HG, Haase AT, Knight V. Induction of immunity in man by crystalline adenovirus type 5 capsid antigens. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973;143:905-10.
61. Molnar-Kimber KL, Serman DH, Chang M, et al. Impact of preexisting and induced humoral and cellular immune responses in an adenovirus-based gene therapy phase I clinical trial for localized mesothelioma. *Hum Gene Ther* 1998;9:2121-33.
62. Ilan Y, Prakash R, Davidson A, et al. Oral tolerization to adenoviral antigens permits long-term gene expression using recombinant adenoviral vectors. *J Clin Invest* 1997;99:1098-106.
63. Kaplan JM, St George JA, Pennington SE, et al. Humoral and cellular immune responses of nonhuman primates to long-term repeated lung exposure to Ad2/CFTR-2. *Gene Ther* 1996;3:117-27.
64. Kay MA, Holterman AX, Meuse L, et al. Long-term hepatic adenovirus-mediated gene expression in mice following CTLA4Ig administration. *Nat Genet* 1995;11:191-7.
65. Schulick AH, Vassalli G, Dunn PF, et al. Established immunity precludes adenovirus-

- mediated gene transfer in rat carotid arteries. Potential for immunosuppression and vector engineering to overcome barriers of immunity. *J Clin Invest* 1997;99:209-19.
66. Walter J, You Q, Hagstrom JN, Sands M, High KA. Successful expression of human factor IX following repeat administration of adenoviral vector in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:3056-61.
67. Jonsson MI, Lenman AE, Frangsmyr L, Nyberg C, Abdullahi M, Arnberg N. Coagulation factors IX and X enhance binding and infection of adenovirus types 5 and 31 in human epithelial cells. *J Virol* 2009;83:3816-25.
68. Kalyuzhniy O, Di Paolo NC, Silvestry M, et al. Adenovirus serotype 5 hexon is critical for virus infection of hepatocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:5483-8.
69. Cotter MJ, Zaiss AK, Muruve DA. Neutrophils interact with adenovirus vectors via Fc receptors and complement receptor 1. *J Virol* 2005;79:14622-31.
70. Shayakhmetov DM, Gaggar A, Ni S, Li ZY, Lieber A. Adenovirus binding to blood factors results in liver cell infection and hepatotoxicity. *J Virol* 2005;79:7478-91.
71. Tsai V, Varghese R, Ravindran S, Ralston R, Vellekamp G. Complement component C1q and anti-hexon antibody mediate adenovirus infection of a CAR-negative cell line. *Viral Immunol* 2008;21:469-76.
72. Sprangers MC, Lakhai W, Koudstaal W, et al. Quantifying adenovirus-neutralizing antibodies by luciferase transgene detection: addressing preexisting immunity to vaccine and gene therapy vectors. *J Clin Microbiol* 2003;41:5046-52.

*¿Podemos llegar específicamente al intestino
incorporando a un Ad5 elementos de Ad
salvajes causantes de gastroenteritis?*



Capítulo 3

*Biosafety and Biodistribution of chimeric adenoviruses
to the gastrointestinal tract:
A new approach to selective gene delivery to the intestine*

BIOSAFETY AND BIODISTRIBUTION OF CHIMERIC ADENOVIRUSES TO THE GASTROINTESTINAL TRACT:

A NEW APPROACH TO SELECTIVE GENE DELIVERY TO THE INTESTINE

ABSTRACT

BACKGROUND: The lack of vectors for selective gene delivery to the intestine has hampered the development of gene therapy strategies for chronic intestinal diseases.

AIM: We hypothesized that chimeric adenoviruses (Ad) build up with a combination of the widely known Ad5 (species C) and elements of Ad40 (species F) might hold the intestinal tropism of the F serotype and might thus be useful as vectors for gene delivery to the intestine.

METHODS: The biosafety and biodistribution of several chimeric Ad were tested in healthy and colitic CD1 mice after oral, rectal and intravenous routes. Animals were euthanized 3 days after vectors administration. The expression of the reporter gene *LacZ* (*E. coli* β -galactosidase) was measured by luminometry in extracts of 15 different organs and the expression of the reporter gene GFP (green fluorescent protein) served to identify the cell types transduced. Anti-Somatostatin, anti-chromogranin-A (Chr-A) and anti-CD68 antibodies were used to characterize these cell types.

RESULTS: Our results indicate that, among the chimeric adenoviruses studied, the Ad5/40S (Ad40S) which bears the short fiber of Ad40, exhibits a biodistribution pattern which makes it suitable to target the gastrointestinal epithelium. Luminometry showed that whereas after oral and rectal administration Ad5 infectivity was very poor in all gastrointestinal organs, Ad5/40S infected the colon and to some extent the small intestine. After oral and rectal administration of Ad40SGFP, transgene expression was evidenced in epithelial (IECs), in enteroendocrine cells and in the submucosa of small intestine and colon of healthy animals. In colitic mice Ad5/40S intrarectal administration resulted in a marked increase in Chr-A immunoreactivity, as well as in an apparent increase in the number of GFP+ cells. No apparent signs of toxicity were observed with any of the adenoviral vectors used in this study.

CONCLUSION: This study points at the chimeric adenovirus Ad5/40S as a putative vector for a selective delivery of genes to treat intestinal diseases such as IBD.

INTRODUCTION

Viruses are widely used for introducing exogenous genes in an organism. Among them, retroviruses [1], adenoviruses [2, 3], adeno-associated viruses [4, 5] and herpesviruses [6] have been widely employed. Adenoviruses have become widely used vectors in clinical trials in humans for multiple reasons since: *a)* They can infect a broad variety of cell types, both quiescent and in division; *b)* they are non-integrative viruses, and thus convey low risk of insertional mutagenesis; *c)* they can bear relatively large genes. In addition, current production techniques allow to obtain high titers (up to 10^{13} particles/mL) and to modify its capsid and thus its natural tropism [7].

The progress of intestinal gene therapy has been hampered by the lack of viral vectors to effectively transfer genes of interest directly and specifically to intestinal tissues.

Adenoviruses are double-stranded viruses that protect its nucleic acid with a proteic capsid of icosahedric geometry without an external cover. The capsid bears the so-called fiber proteins which often exhibit a knob protein at the outer end and are attached to the capsid through the penton base protein. The viral fiber protein seems to be crucial for the attachment of the virus to the target cell. Adenoviral vectors bind to cell membrane integrins ($\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$) and internalize by receptor mediated endocytosis [7]. The Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) acts as an important virus receptor, is widely expressed in mammals and is responsible for Ad5 natural tropism [8, 9]. However, several studies have revealed that *in vivo* other adenoviral receptors can bind the fiber knob [7, 10-12] with high affinity. Recent research has also demonstrated that CAR is not expressed in the brush border of polarized epithelial cells [13, 14]; it is rather restricted to the basolateral space. Thus, direct access for Ad through CAR is normally hindered in normal healthy tissue.

The widely used Ad5 does not bind efficiently to differentiated enterocytes [15, 16] and when administered by the intravenous route it exhibits a marked hepatic tropism. In contrast, Ad40 and Ad41 (enteric adenoviruses associated to pediatric gastroenteritis) exhibit an intestinal tropism, but limited data are available regarding their biodistribution and their effects *in vivo*. This is due both to the complexity of their amplification and to the limited knowledge of their genome. We hypothesized that pseudo-typed (*i.e.* chimeric) adenoviruses bearing different combinations of Ad40 and Ad5 capsid proteins might exhibit an intestinal tropism upon oral or rectal administration, and might thus be suitable for gene delivery to the intestine.

Biodistribution and biosafety of chimeric Ad5/40 have only been studied following intravenous administration [9]. Since Ad40 seems to infect the host by the oral or rectal routes, we decided to study the biosafety and biodistribution of several chimeric Ad (Ad40S, Ad40SL, Ad5.40 and Ad40.5) by three different routes (intravenous, oral and intrarectal). These chimeric adenoviruses were generated in order to find out if any of them might

effectively transduce colonic cells (our target tissue) after a local administration, and whether or not the hepatic tropism is still dominant after intravenous administration.

We further aimed to evaluate the biosafety and biodistribution of chimeric 5/40 Ad in healthy and colitic mice in order to compare results obtained with the classic Ad5 and with preexisting literature, as well as to assess the putative value of such chimeric adenoviruses for the specific delivery of genes of interest to treat chronic intestinal diseases. We describe here that among the chimeric adenoviruses tested Ad5/40S (*i.e.* Ad40S) exhibited a specific intestinal tropism without significant adverse effects upon oral or rectal administration.

MATERIALS AND METHODS

Animals

CD1 healthy female mice (8-10 weeks old, 26-28 g body weight), purchased from Charles River (Lyon, France) were acclimatized for at least one week before entering the study. Mice were kept under specific pathogen free conditions in a protected autonomous unit throughout the experimental period with free access to food (A04 chow, PanLab, Barcelona) and water, and under standard conditions (22°C, 70-80% relative humidity, and a light/dark cycle of 12 h/12 h). A total of 157 mice were employed in these studies.

Mice received either saline (SSF) (0.2 mL) or $0.3 \times 10^9 - 10^9$ infectious units (IU) of one of the Ad studied vehicled in 0.2 mL saline either orally, rectally or intravenously (**table 1**).

# of animals per Ad and route of administration	<i>i.v.</i>	<i>i.r.</i>	<i>p.o.</i>	TOTAL
SSF	5	5	5	15
Ad5 β -gal	12	12	12	36
Ad40SL β -gal	5	5	5	15
Ad40.5 β -gal	5	5	5	15
Ad5.40 β -gal	5	5	5	15
Ad40S β -gal	5	10	10	25
Ad40SGFP	5	8	8	21
Ad5GFP	5	5	5	15

TABLE 1: Number of healthy animals receiving different Ad for each route of administration.

After evaluating the biosafety and biodistribution in healthy animals, the virus exhibiting the desired profile in healthy animals was given intrarectally to colitic CD1 female mice (**table 2**).

# of animals per treatment	<i>i.r.</i>
HEALTHY CONTROLS	10
DSS + SSF	16
DSS + Ad5 β -gal	20
DSS + Ad40S β -gal	10
DSS + Ad5GFP	6
DSS + Ad40SGFP	6

TABLE 2: Number of healthy or colitic animals receiving each of the Ad or saline by the intrarectal route.

To induce colitis, mice received a solution of 4% dextran sulphate sodium (DSS) (MP Biomedicals; MW 36-50 kD) in their drinking water during 5 consecutive days (*ad libitum*). Fresh DSS solution was prepared on alternate days. Previous work has demonstrated that administration of 4% DSS in the drinking water during 5 days causes, in this mouse strain, a colitis with rectal mucus discharge, diarrhea, bloody feces, weight loss and change in animal aspect and behavior.

Animals were monitored daily to evaluate fluid and food intake and were assigned an individual disease activity index (DAI, see details below). Adenovirus (Ad5 β -gal, Ad40S β -gal, Ad5GFP or Ad40SGFP) or saline were administered rectally on day 5. Before rectal administration mice were lightly anesthetized with ketamine (Imalgene Merial Labs) / xylazine (Rompun, Bayer) (55/15 mg/kg, administration volume 10 mL/kg i.p.). After Ad inoculation, animals were suspended vertically to prevent seepage (Trendelenburg position).

For biosafety and biodistribution studies in healthy animals, mice were euthanized 3 days after adenoviral administration. For studies in colitic animals, mice were euthanized on day 8 after starting the DSS regime (3 days after adenoviral administration), to recover tissues for luminometric analysis, immunohistochemistry and myeloperoxidase activity.

All experiments involving animals were approved by the Ethical Committee and the Biosafety Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona.

Adenoviral vectors

The recombinant E1 deleted type 5 adenoviral vectors, encoding *E. coli* β -galactosidase (β -gal) or green fluorescent protein (GFP) under the control of the cytomegalovirus promoter were provided by Dr. M. Chillón (CBATEG, Bellaterra, Barcelona, Spain). The chimeric Ad5/40 (Ad40S, Ad40SL, Ad5.40 and Ad40.5) were generously donated by Dr. H. Hamada (Sapporo Medical University, JAPAN) and amplified by Dr. M. Chillón. These chimeric adenoviruses resulted from combinations of fiber5 (from Ad5) and fiber40 (from Ad40) proteins (see figure A). Viruses were propagated in HEK293 cells and purified by ultracentrifugation through two CsCl gradients. The titer was determined by plaque assay on HEK293 cells. Viral stocks were diluted in 10% glycerol and stored at -80°C.

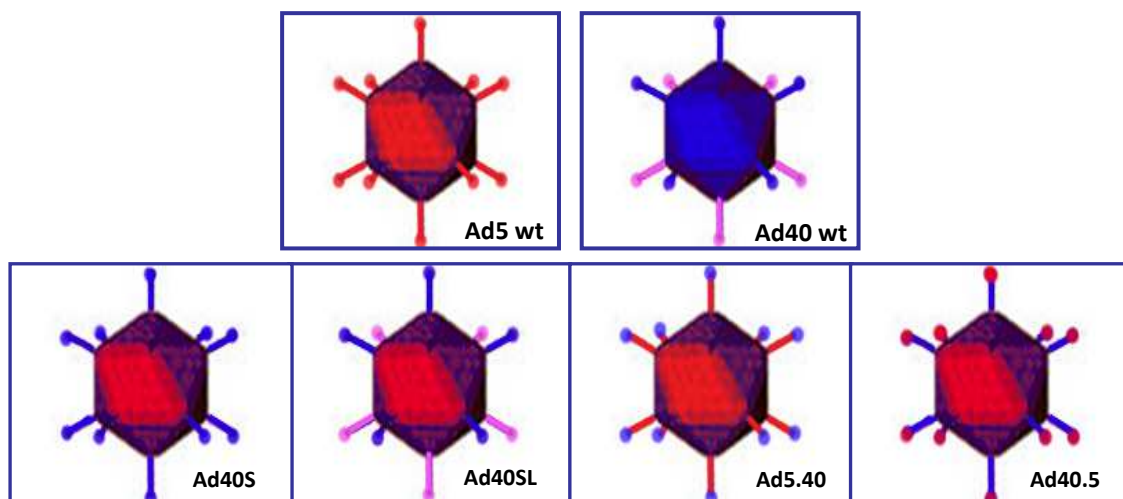


FIGURE A: Chimeric Ad 5/40 employed in the biosafety and biodistribution studies. Depending on the Ad type fiber protein domains are red (*Ad5*), blue (*short fiber of Ad40*) or pink (*long fiber of the Ad40*).

Evaluation of clinical colitis, euthanasia and tissue collection

In all colitic animals, weight loss, stool consistency, fecal blood loss and animal aspect were determined daily to assign an individual daily DAI as previously described [17].

DAI was obtained by combining scores of a) weight loss (0-4 points), b) stool score (0-4 points), c) animal aspect (0-3 points) and d) blood in feces (0-3 points). Total DAI score was the sum of these figures, ranging from 0 (unaffected) to 14 (severe colitis). See **table 3** for a detailed explanation.

Mice were euthanized and plasma was obtained from whole blood collected by heart puncture performed under isoflurane (Isoba[®]vet, Shering-Plough) anesthesia.

BODY WEIGHT CHANGE		SCORE	STOOL SCORE		SCORE
<0% (<i>gain</i>)		0	Normal		0
0-5% (<i>loss</i>)		1	Pasty feces		1
5-10% (<i>loss</i>)		2	Semi liquid feces, perianal dirt		2
10-15% (<i>loss</i>)		3	Aqueous feces, dirty / wet tail		3
>15% (<i>loss</i>)		4	Very aqueous, dirty / wet tail and back		4
ANIMAL ASPECT		SCORE	BLOODY FECES		SCORE
Normal		0	Semi-quantitative evaluation depending on the extent of blood loss observed.		0-3
Coarse hair		1			
Coarse hair and abnormal activity		2			
Obvious dehydration		3			
ENDPOINT CRITERIA		SCORE	A score of 3 in two out of the three parameters analyzed was taken as endpoint criteria.		
Body Weight (<i>Morton & Griffiths</i>)		0-3			
Aspect (<i>Morton & Griffiths</i>)		0-3			
Behavior: very aggressive or comatose?		Yes=3 No=0			
TABLE 3: Parameters and scores related with the DAI and endpoint criteria calculation. <i>Morton DB and Griffiths PH, Vet Rec. 1985;116(16):431-436.</i>					

Spleen, liver, pancreas, lung, esophagus, mesenteric lymph nodes, stomach, proximal and distal small intestine, proximal and distal colon, skeletal muscle, kidney, uterus and ovary were harvested and either fixed in 4% paraformaldehyde for immunohistochemical / immunofluorescence analysis, or frozen in liquid nitrogen for luminometry or myeloperoxidase activity (colon). Before harvesting, gastrointestinal tissues were carefully rinsed with phosphate buffered saline (PBS) to eliminate luminal contents. Livers and spleens were weighted and colon length and weight measured as an index of colonic inflammation.

Aminotransferase serum levels (aspartate aminotransferase -AST- and alanine aminotransferase -ALT-) were measured with an automated analyzer in an independent laboratory (Clinical Biochemistry Unit, Veterinary Faculty, UAB).

Beta-galactosidase immunohistochemistry

Liver, spleen, small intestine, colon, kidney and lung samples were routinely processed, and 3 µm sections of paraffin-embedded tissues were deparaffinized by standard histological procedures. Endogenous peroxidase activity was quenched by incubation with hydrogen peroxide 0.3% in methanol. Antigen retrieval was performed by incubation of the sections for 6 min in boiling citrate buffer (10 mM, pH 6).

Endogenous biotin was blocked by addition of the avidin / biotin blocking kit (SP-2001, Vector[®]), following the manufacturers' instructions. Non-specific binding was blocked

by incubation with 4% goat serum in PBT (phosphate buffered saline + triton X 100) at room temperature. After an overnight incubation with the primary antibody (rabbit polyclonal antibody to *E. coli* β -galactosidase) at 4°C, sections were incubated two hours at room temperature with the secondary antibody (biotinylated goat anti rabbit IgG) (see table 4). The reagent Vectastain® ABC ELITE (PK-6100, Vector®) was kept during 30 min at 37°C. The immunolabeling was developed with diaminobenzidine (DAB, SK-4100, Vector®), and slides were counterstained with hematoxylin. Two negative controls were included: sections from mice which had not been inoculated with any adenoviral vector (*i.e.*, are SSF-administered mice) and sections from treated animals in which the primary antibody was omitted.

	ANTIBODY	DILUTION	REFERENCE
Anti β-galactosidase	Primary rabbit polyclonal antibody to <i>E. coli</i> β -gal	1/900	Abcam , ab616-1
Biotinilated IgG	Secondary biotinylated goat anti-rabbit IgG	1/200	Santa Cruz , sc-2040
Anti Chromogranin- A	Primary rabbit anti Chr-A (H-300) polyclonal antibody	1/50	Santa Cruz , sc-13090
Anti Somatostatin	Primary rabbit anti-somatostatin polyclonal antibody	1/150	Chemicon AB5494
Anti CD68	Primary rabbit anti CD68 polyclonal antibody	1/50	Santa Cruz , sc-9139
Texas Red IgG	Secondary goat anti rabbit Texas Red IgG	1/150	Santa Cruz , sc-2780

TABLE 4: *Primary and secondary antibodies employed in the immunohistochemical and immunofluorescence studies in healthy and colitic mice.*

Chromogranin-A, Somatostatin and CD68 immunofluorescences

Liver, spleen, pancreas, stomach, small intestine and colon samples were routinely processed as described before. For co-localization studies tissue from mice treated with AdGFP were chosen to investigate cell types transduced with the Ad.

After deparaffining and blocking with 4% goat serum (one hour), primary rabbit anti-chromogranin A polyclonal antibody or primary rabbit anti-somatostatin polyclonal antibody were added to label enteroendocrine cells; primary rabbit anti-CD68 polyclonal antibody was used to identify resident macrophages. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C (see table 4). The secondary goat anti rabbit IgG conjugated with Texas Red was incubated 1h at room temperature. No counterstaining technique was employed. Two negative controls were included: sections from mice which had not been inoculated with any adenoviral vector and sections from treated animals in which the primary antibody was omitted. Samples were analyzed with a confocal microscope (Leica Microsystems Heidelberg GmbH) and a fluorescence microscope (Zeiss Axioscop 40) with specific filter sets.

Luminometric analysis

The expression of the reporter gene *LacZ* (*i.e.*, *E. coli* β -galactosidase) was calculated using the *Galacto-light Plus™ kit*, (Tropix, T101) and luminescence was measured in a luminometer in extracts of 15 different organs, kept at -80°C until assay. Tissue samples

were minced and sonicated in 100 μ L of Lysis Buffer (LB). Then, after a freeze/thaw cycle, 8 μ L of supernatant were transferred to a 96-well white plate. One hundred microliters of a 1:100 dilution of Galacton-Plus in Galacto Reaction Buffer were added to each well, protecting the plate from the light. After one hour of incubation the plate was placed in the Luminoskan RS (Labsystems) and 100 μ L of accelerating reagent were added. The intensity of light in relative luminescent units (RLU) corresponds to the β -galactosidase activity, which is proportional to Ad infection.

Myeloperoxidase (MPO) activity

MPO activity has been widely used to determine the extent of cellular infiltration into inflamed tissues [18]. Neutrophil infiltration into colon was quantified by measuring the activity of this enzyme, adapting a previously described assay [18] for use in a 96 well plate.

Frozen colon samples (50-70 mg) were thaw and homogenized with a conic glass potter in 0.5% hexadecyltrimethyl ammonium bromide (HTAB, H9151, Sigma) in 50 mM phosphate buffer, pH 6.0 (1 mL/50 mg tissue) and centrifuged (4°C, 3000 xg , 10 min).

MPO was assayed in the supernatant by adding 1 mg/mL of *o*-dianisidine dihydrochloride (Sigma, D3252) and H₂O₂ 1% (Sigma). The change in optical density was measured at 450 nm at 3 minute intervals (TECAN Infinite F200). One unit of MPO activity was defined as the amount of enzyme that degraded 1 μ mol of peroxide per min at 25°C.

Microbiological controls in tissues of healthy and colitic mice

Since bacterial translocation is often found in colitic mice, and since translocated bacteria may eventually be β -galactosidase positive, we undertook a series of experiments to ascertain to what extent luminometric measures yield by colitic tissue might be biased by the presence of such β -gal positive bacteria. These studies were performed in either healthy or colitic mice (5 days on 4% DSS) which did not receive any adenoviral vector. At euthanasia (day 8), samples of liver, ileum, caecum and colon were harvested in duplicates and stored at -80°C until luminometric analysis or processed for microbiological cultures (within the same day).

Samples were processed as follows: each tissue sample was divided in four pieces; two of them were mechanically homogenized (Potter) and the other two were sonicated (as for luminometry). As diluent, 100 μ L of either PBS 1X or lysis buffer were added to samples. After a short centrifugation (3000 xg , 1 min) to recover the supernatant, an additional volume of 100 μ L of the corresponding diluent was added. After a second centrifugation step (3000 xg , 1 min), 100 μ L of the supernatant fraction were cultured in Petri dishes and the rest was stored at -80°C for luminometric studies (see above). Thus, a total of eight aliquots per tissue per mouse were analyzed, 4 processed for bacterial growth and 4 for luminometry. See **table 5** for further details.

Cultures of tissue extracts were performed by a microbiologist blinded to the study. Aliquots of tissue extracts were transferred to agar MacCONKEY (MK) Petri dishes and incubated at 37°C for 24-48 hours in aerobic conditions. Colonies which exhibit the traits of the *Enterobacteriaceae* family were considered total *Enterobacteria*. Beta-galactosidase positive bacteria were identified with the chromogen *o*-nitrophenil- β -D-galactopiranoside (ONPG probe). Results are expressed as log CFU/100 μ L.

SAMPLE	PROCEDURE	DILUENT	TECHNIQUE
LIVER	sonicated	lysis buffer	luminometry M. culture
		PBS 1X	luminometry M. culture
	MH	lysis buffer	luminometry M. culture
		PBS 1X	luminometry M. culture
ILEUM	sonicated	lysis buffer	luminometry M. culture
		PBS 1X	luminometry M. culture
	MH	lysis buffer	luminometry M. culture
		PBS 1X	luminometry M. culture
CAECUM	sonicated	lysis buffer	luminometry M. culture
		PBS 1X	luminometry M. culture
	MH	lysis buffer	luminometry M. culture
		PBS 1X	luminometry M. culture
COLON	sonicated	lysis buffer	luminometry M. culture
		PBS 1X	luminometry M. culture
	MH	lysis buffer	luminometry M. culture
		PBS 1X	luminometry M. culture

TABLE 5: Group of samples analyzed in the microbiological/ luminometric studies.

Four tissue samples (liver, ileum, caecum and colon) were harvested from three healthy and three colitic CD1 mice in order to compare two homogenization techniques and two diluents to contrast efficiency in bacterial lysis between procedures and the effectiveness of the intestinal flushing carried out during the euthanasia of animals.

MH: mechanically homogenized, **M. culture:** microbial culture.

Statistical analysis

All the data obtained were plotted and statistically analyzed using standard software (GraphPad Prism 4.0 for Windows). Comparison of mean values was made using the Student t-Test (comparisons between two groups) or ANOVA and Bonferroni's multiple-comparison post-test (for more than two groups). Comparison of DAI values was made according to the Kruskal-Wallis one-Way ANOVA followed by multiple-comparison Dunn's post-test. Box plots depict 5th, 25th, 50th (median), 75th and 95th percentiles. P values < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Biosafety of chimeric adenoviruses in healthy animals

No signs of toxicity or early deaths were detected with either of the chimeric Ad studied or with the classic Ad5 with any route of administration. Only a moderate increase in spleen weight and a slight increase in ALT but not AST serum levels were detected in some groups of animals (**figure 1**). No significant histopathological findings were observed in hematoxylin & eosin stained sections of the 15 organs harvested (images not shown).

Biodistribution pattern of chimeric adenoviruses in healthy animals

As shown in **figure 2**, β -galactosidase activity (measured by luminometry) confirmed an obvious hepatic and splenic tropism for Ad5 given intravenously. This hepatic and splenic tropism was markedly decreased for most of the chimeric adenoviruses after intravenous injection. No significant transduction was found in any gastrointestinal segment upon intravenous administration of any of the adenoviruses tested. After oral and intrarectal administration no efficient transduction was found in either liver, lung, spleen or muscle for any of the viruses analyzed. Beta-gal activity could be detected in some lungs of Ad5 β -gal treated mice, probably due to the erosion of the epithelium during gavage, which may favor viral entry and transduction (fig. 2.1.B). Notoriously, after oral and rectal administration of Ad40S β -gal a significant β -galactosidase activity was found in colon; in contrast no significant β -galactosidase activity was found in the gastrointestinal tract for any other adenovirus studied.

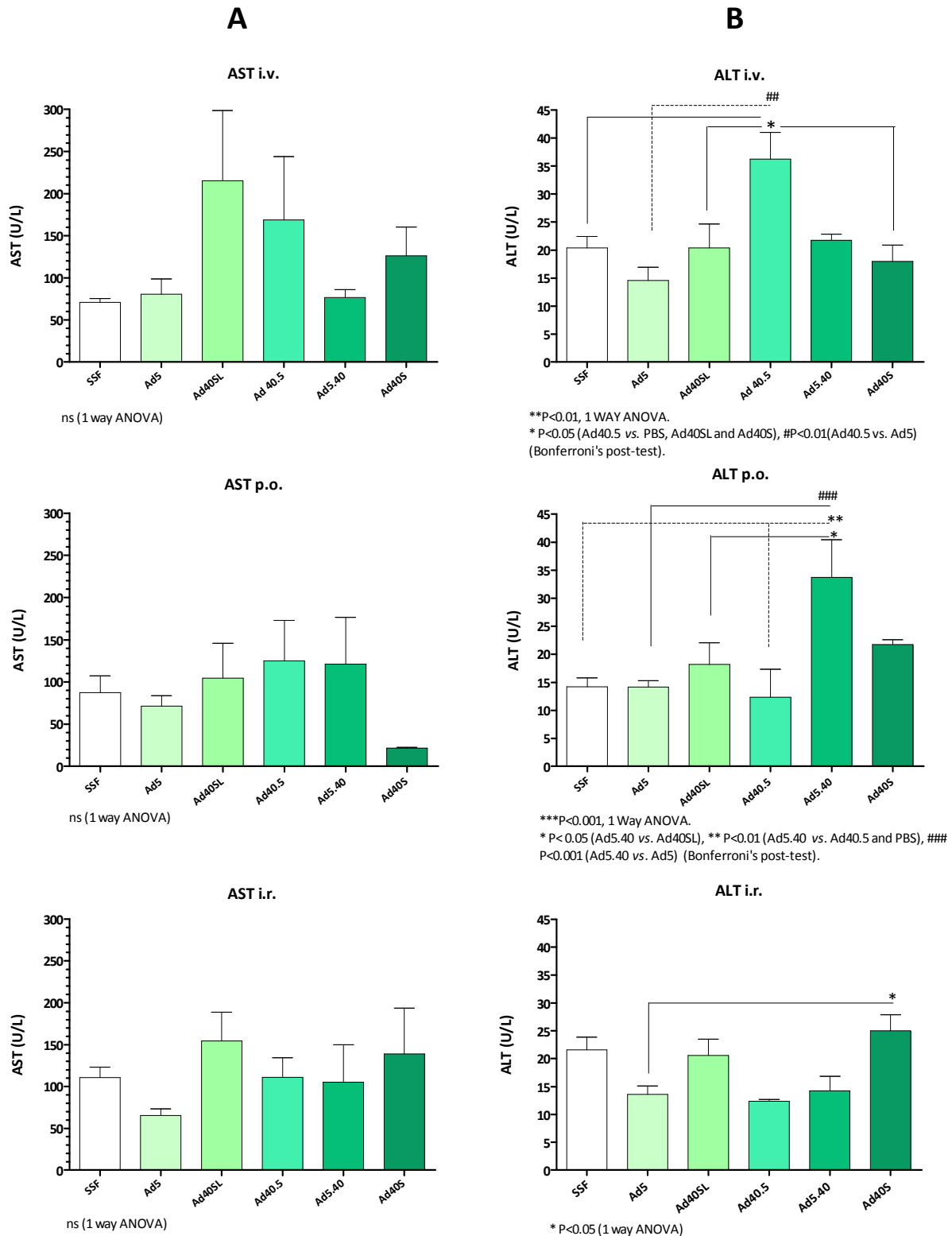


FIGURE 1: Serum aminotransferase levels of animals treated with single doses of the corresponding adenovirus or saline (SSF) as control, administered by intravenous, oral or intrarectal routes.

Figure **1A** shows AST (aspartic aminotransferase) levels (U/L) and figure **1B**, ALT (alanin aminotransferase) levels (U/L).

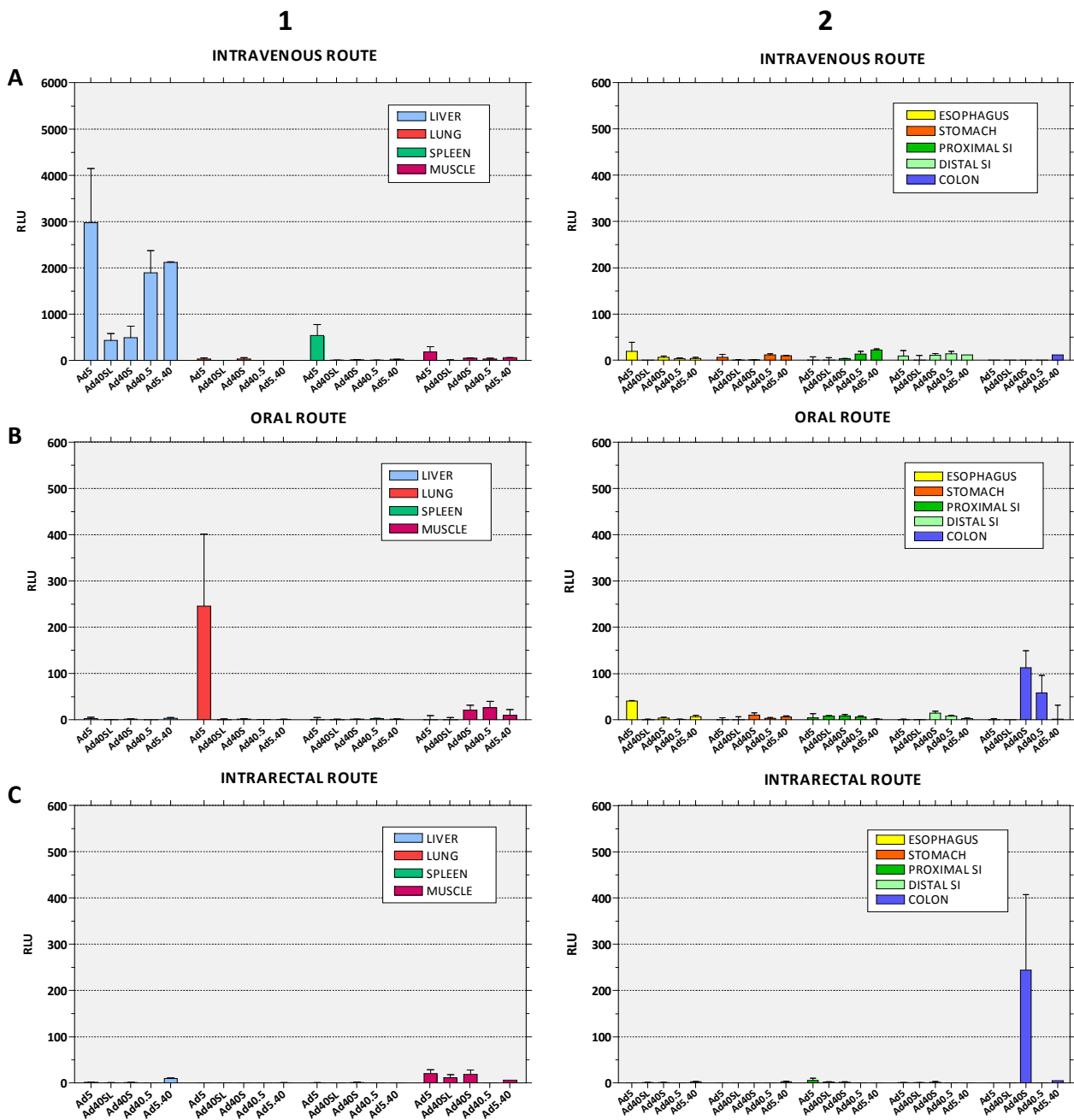


FIGURE 2: BETA-GALACTOSIDASE ACTIVITY (LUMINOMETRY). 1) β -galactosidase activity found in liver, lung, spleen and muscle after single doses of the corresponding vector by three different routes of administration. **2)** β -galactosidase activity in gastrointestinal tissues by three different routes. Note that figure 2.1.A has a 10 times bigger scale compared to the other graphs. Results are expressed as mean \pm SEM.

Immunohistochemical studies revealed a perinuclear *E. coli*'s β -galactosidase immunoreactivity in liver of animals receiving Ad5 β -gal intravenously (as positive control) and in colon of animals receiving Ad40S β -gal by the oral and rectal routes, confirming transduction of hepatocytes and enterocytes, respectively (**Fig 3**). Figure 3 illustrates transduction of mucosal, submucosal and also *muscularis mucosae* layers after Ad40S β -gal oral and rectal administration (panels E, F and G).

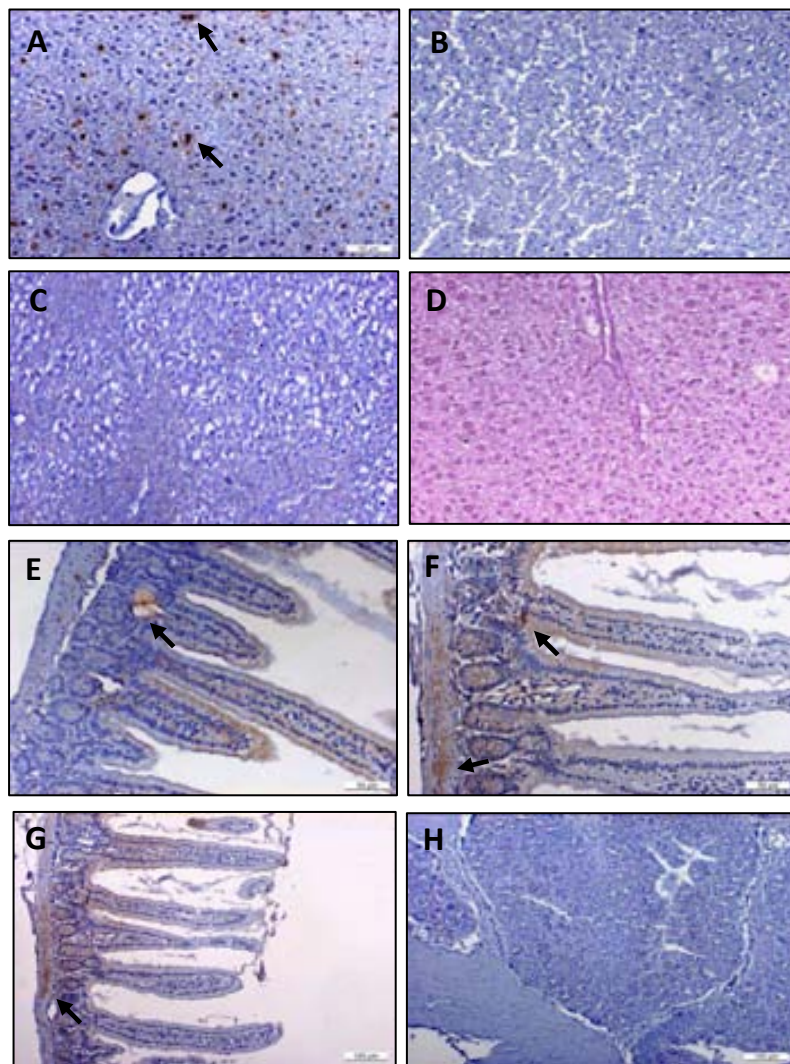


FIGURE 3: Beta-galactosidase immunohistochemistry in liver and intestine sections of CD1 mice treated with single doses of Ad5 β -gal, Ad40S β -gal or SSF (*negative control*). **(A)** Liver, Ad5 β -gal i.v. 200x, **(B)** Liver, Ad40S β -gal i.r. 200x, **(C)** Liver, Ad40S β -gal p.o. 200x, **(D)** Liver, SSF i.v. 200x (*negative control*), **(E)** Intestine, Ad40S β -gal i.r. 200x, **(F)** Intestine, Ad40S β -gal p.o. 200x, **(G)** Intestine, Ad40S β -gal p.o. 100x, **(H)** Intestine, SSF p.o. 100x (*negative control*).

Images show a perinuclear positive stain for the reporter gene β -galactosidase in intestine of Ad40S β -gal treated mice (*oral and intrarectal routes*) and liver of Ad5 β -gal (*intravenous route, positive control*) and lack of staining in negative controls of liver and intestine (SSF).

To discard false positive results due to the presence of exogenous non-viral, microbiota-derived, β -galactosidase we carried out biodistribution studies using GFP expressing vectors. **Figure 4** shows a green fluorescent stain in gastrointestinal tissues (small intestine and colon) of animals which received Ad40SGFP by the oral and intrarectal routes. After intravenous Ad5GFP administration, GFP expression in hepatocytes (as positive control) was much higher than that observed after oral or intrarectal administration of Ad5GFP (not shown). Again, intrarectal administration of Ad40SGFP resulted in a marked expression of the reporter gene (GFP) in intestinal epithelial cells (IECs) of *villi* and crypts.

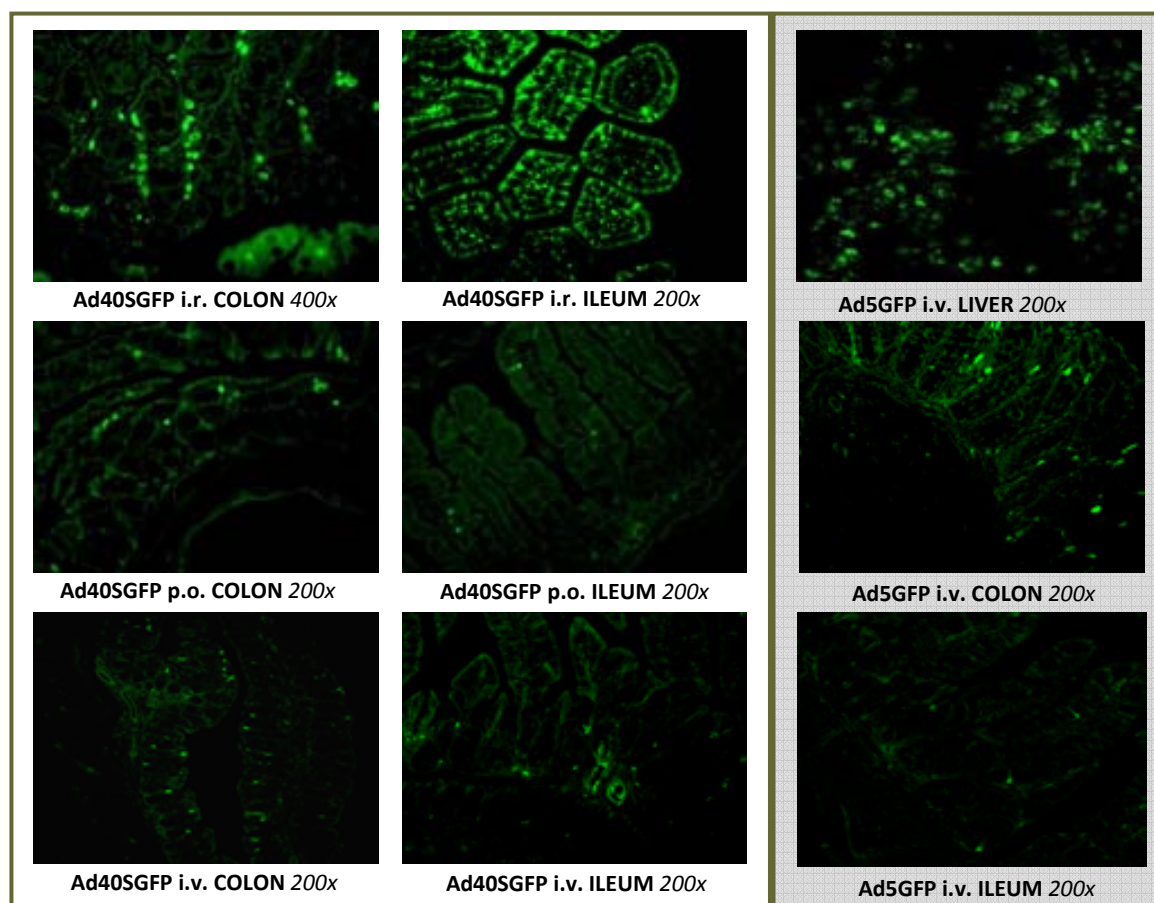


FIGURE 4A: Fluorescence micrographs of ileum, colon and liver sections of healthy CD1 mice treated with Ad40SGFP or Ad5GFP (*positive control*). Images show a green fluorescent positive staining (GFP) in epithelial cells, in *villi* and crypts, and in the submucosa. Positive control: liver of mice treated with Ad5GFP (*i.v. route*).

Of note, some of the GFP+ cells exhibited an enteroendocrine cell-like morphology (*cat pupil-shaped cells*, see fig. 4B, white arrows). Thus, we decided to further characterize GFP+ cells. Employing anti-chromogranin A, anti-somatostatin and anti-CD68 antibodies (as a marker of resident macrophages) we could demonstrate that not only IECs but also enteroendocrine cells and intestinal resident macrophages were transduced. Multiple images for each experimental condition were obtained and representative pictures are shown (**figures 5, 6 and 7**).

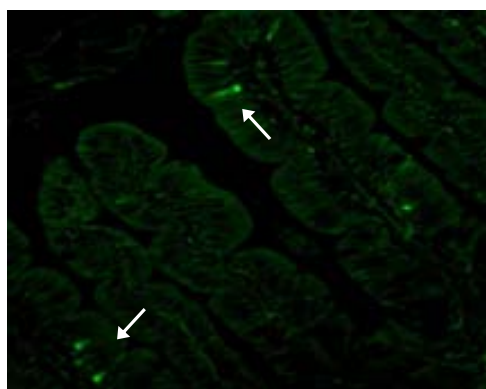


FIGURE 4B: Representative ileum magnification of a mouse administered with Ad40SGFP p.o. Cells expressing the GFP reporter gene could be appreciated (*white arrows*). These cell types share similar morphology (*'cat pupil-shaped' cells*) with enteroendocrine cells.

See Song Yan Wang *et al*, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003 and Michael J. Theodorakis, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006 for cell morphology comparison.

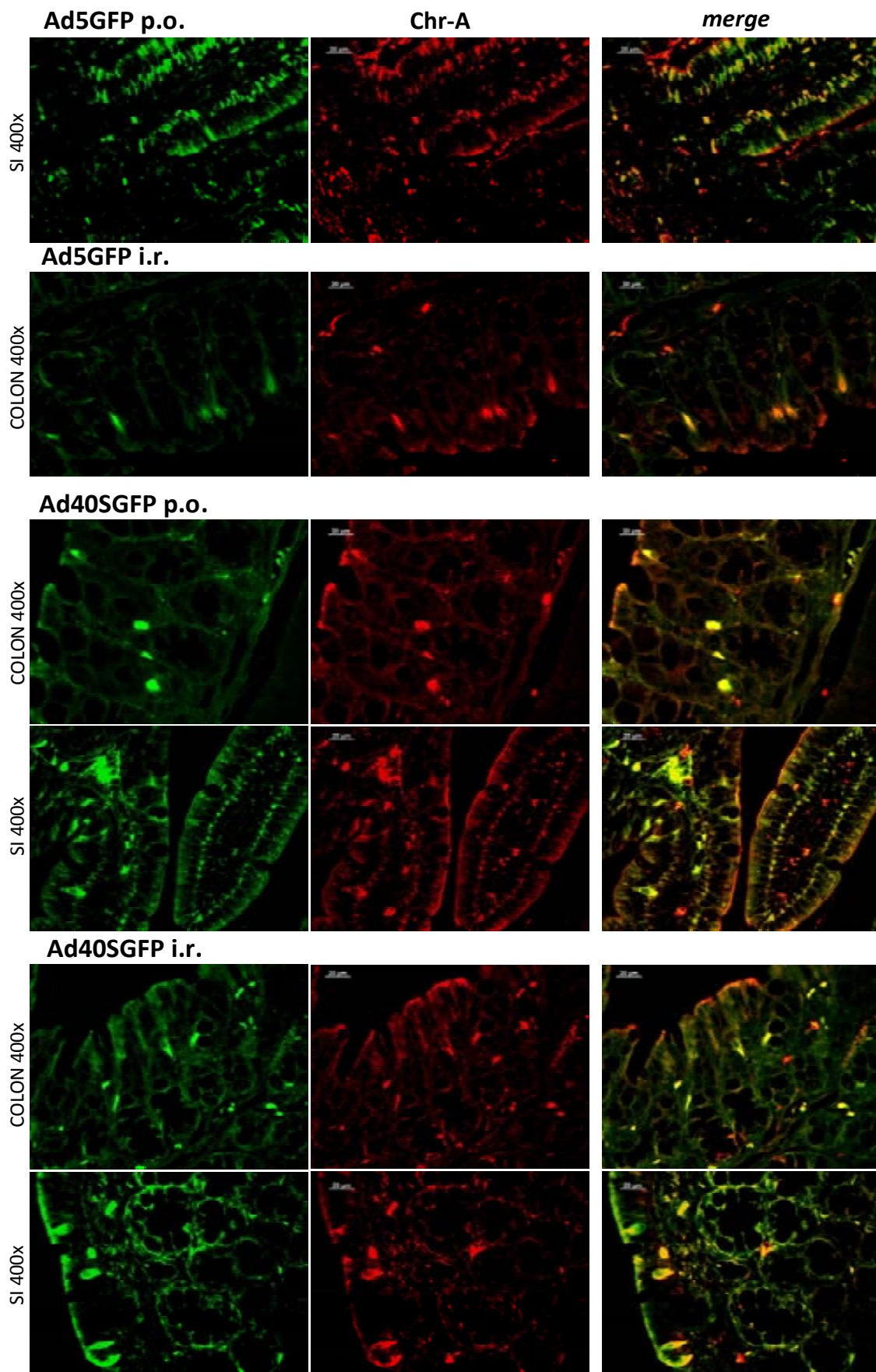


FIGURE 5A: Chromogranin A immunohistochemical analysis of intestinal sections of CD1 **healthy** female mice receiving either Ad40SGFF i.r. and p.o., or Ad5GFP i.r. and p.o. Images show transduced cells within the intestinal tract (*in green*) and co-localization (*in yellow*) of some cells with chromogranin A positive cells (*in red*). *SI*, small intestine.

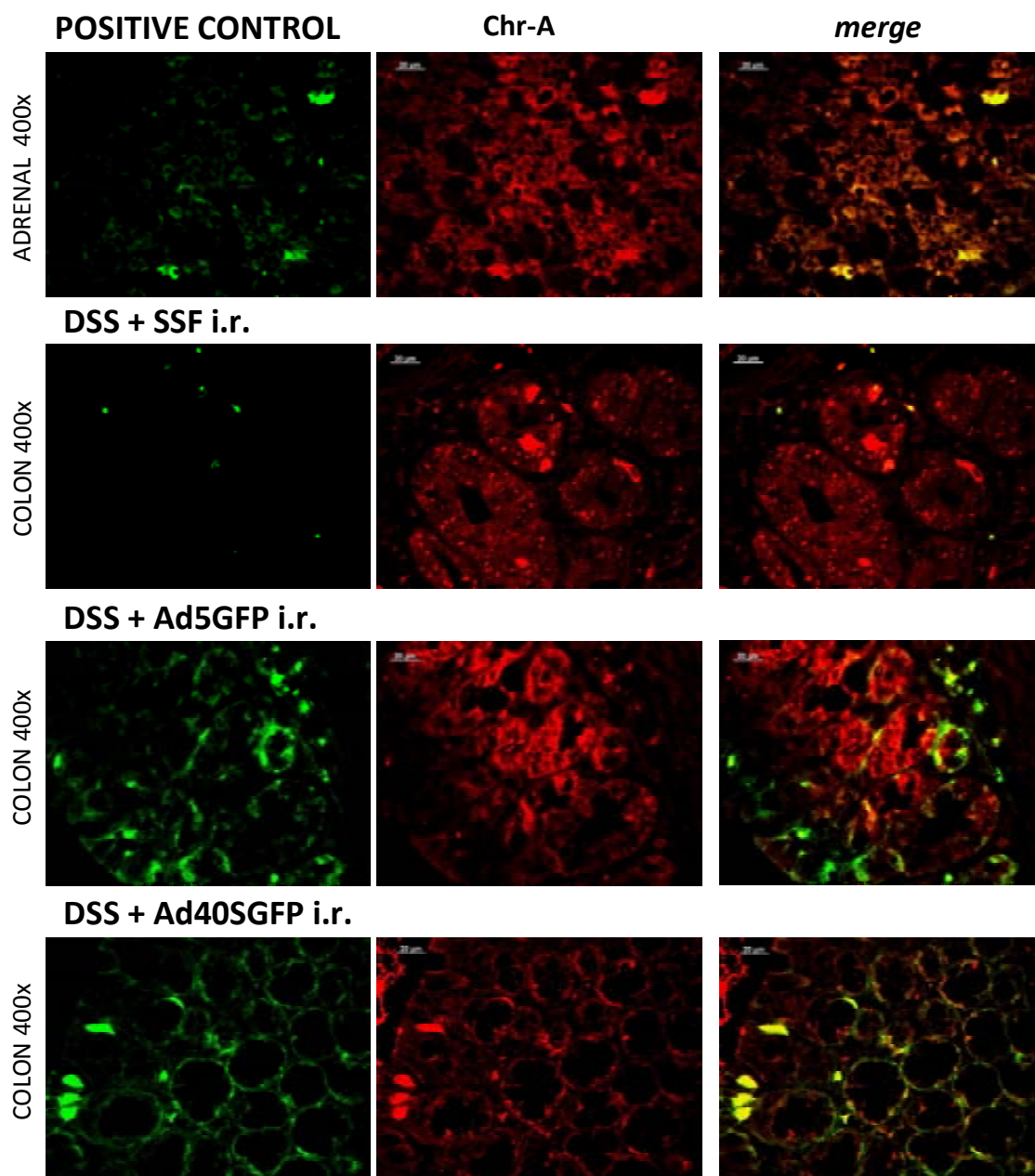
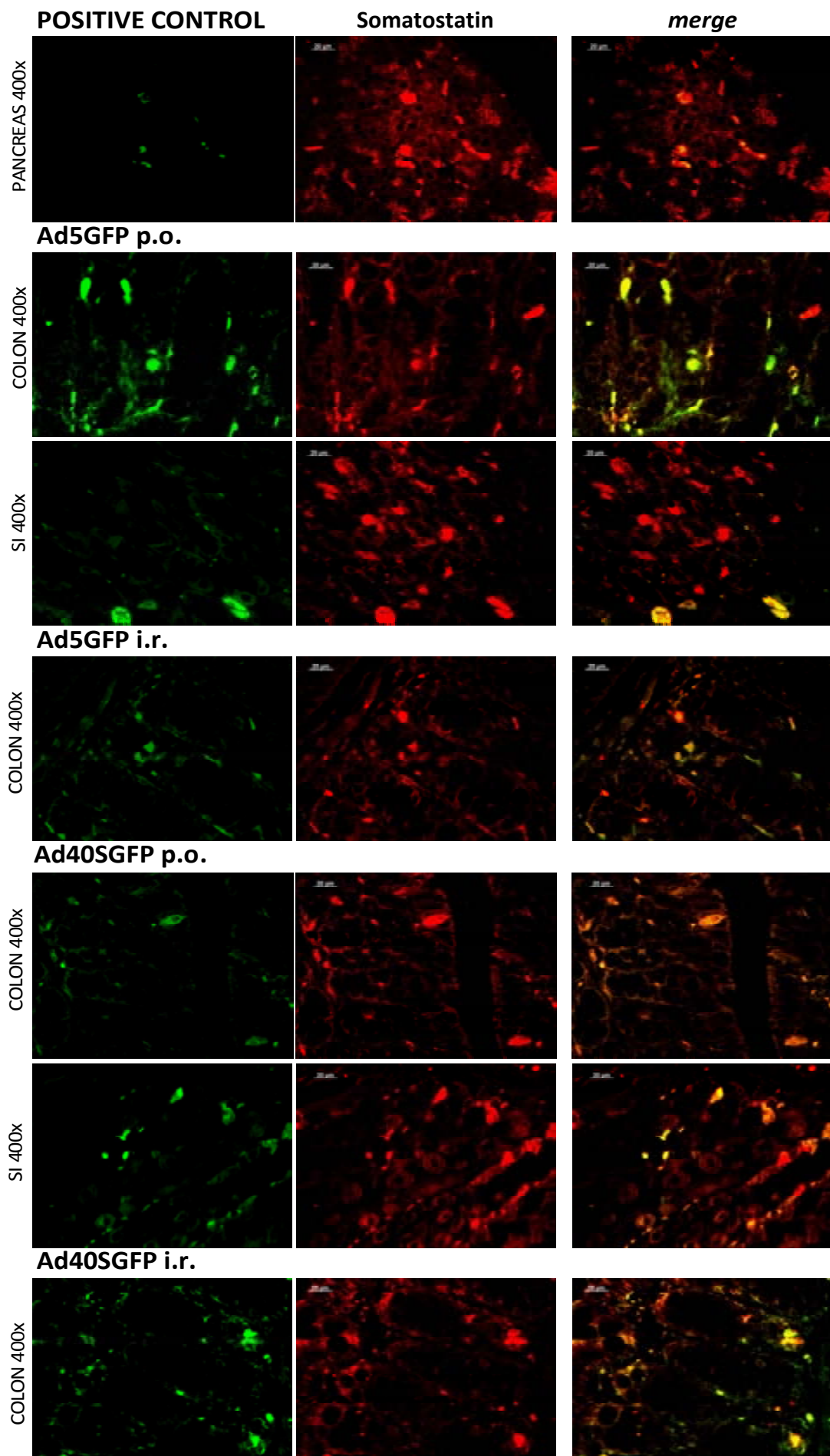


FIGURE 5B: Chromogranin A immunohistochemical analysis of intestinal sections of CD1 **colitic** female mice receiving either Ad40SGFF i.r. or Ad5GFP i.r. Images show transduced cells within the intestinal tract (*in green*) and co-localization (*in yellow*) of some cells with chromogranin A positive cells (*in red*). **Positive control:** adrenal gland of a colitic AdGFP administered mice (intravenous route).

FIGURE 6A (next page): Somatostatin immunohistochemical analysis of intestinal sections of CD1 **healthy** female mice receiving either Ad40SGFF i.r. and p.o., or Ad5GFP i.r. and p.o. Images show transduced cells within the intestinal tract (*in green*) and co-localization (*in yellow*) of some cells with somatostatin positive cells (*in red*). *SI*, small intestine. **Positive control:** pancreas of a healthy AdGFP administered mice.

FIGURE 6A



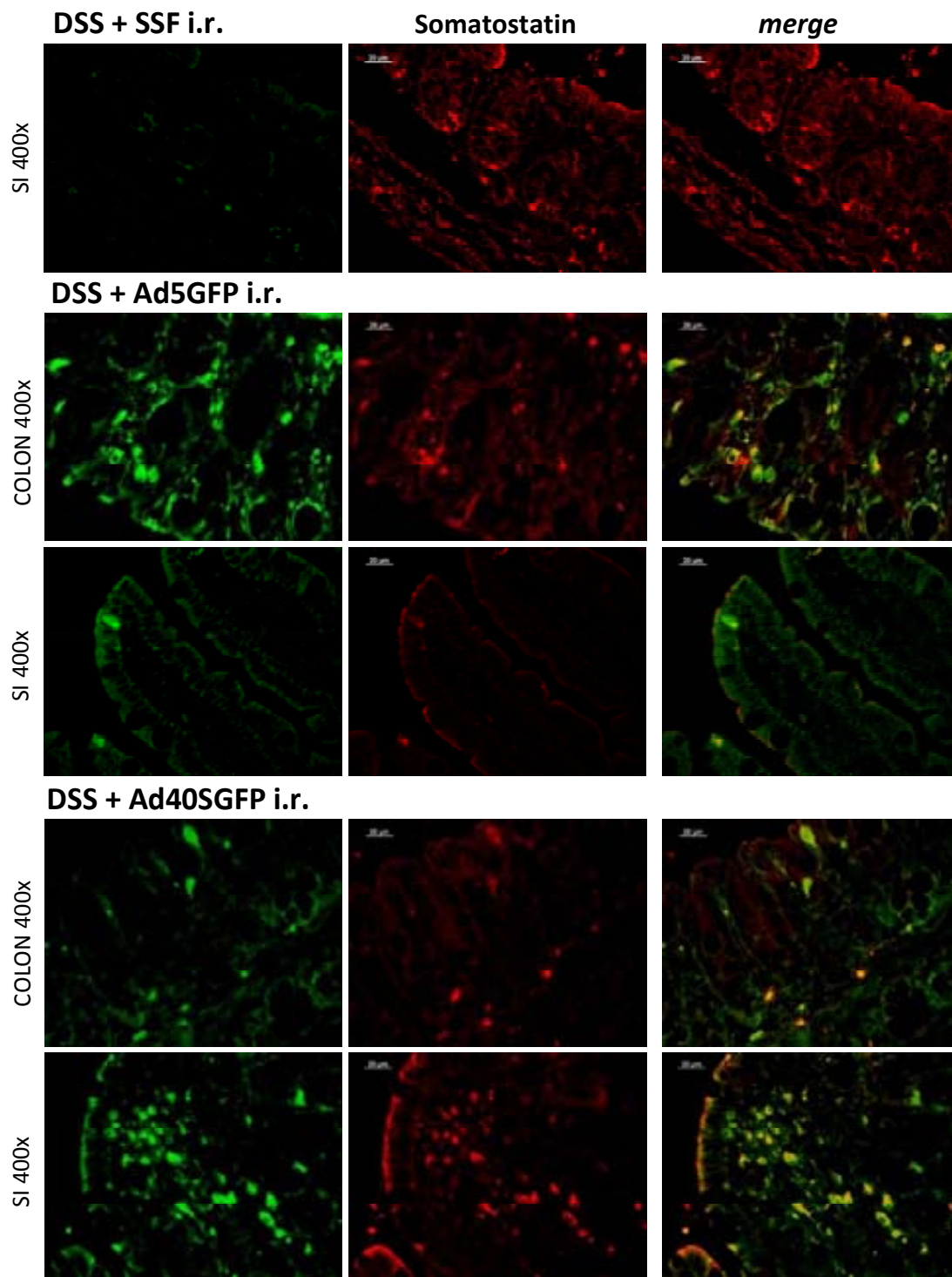


FIGURE 6B: Somatostatin immunohistochemical analysis of intestinal sections of CD1 **colitic** female mice receiving either saline i.r., Ad40SGFF i.r. or Ad5GFP i.r. Images show transduced cells within the intestinal tract (*in green*) and co-localization (*in yellow*) of some cells with somatostatin positive cells (*in red*). *SI*, small intestine.

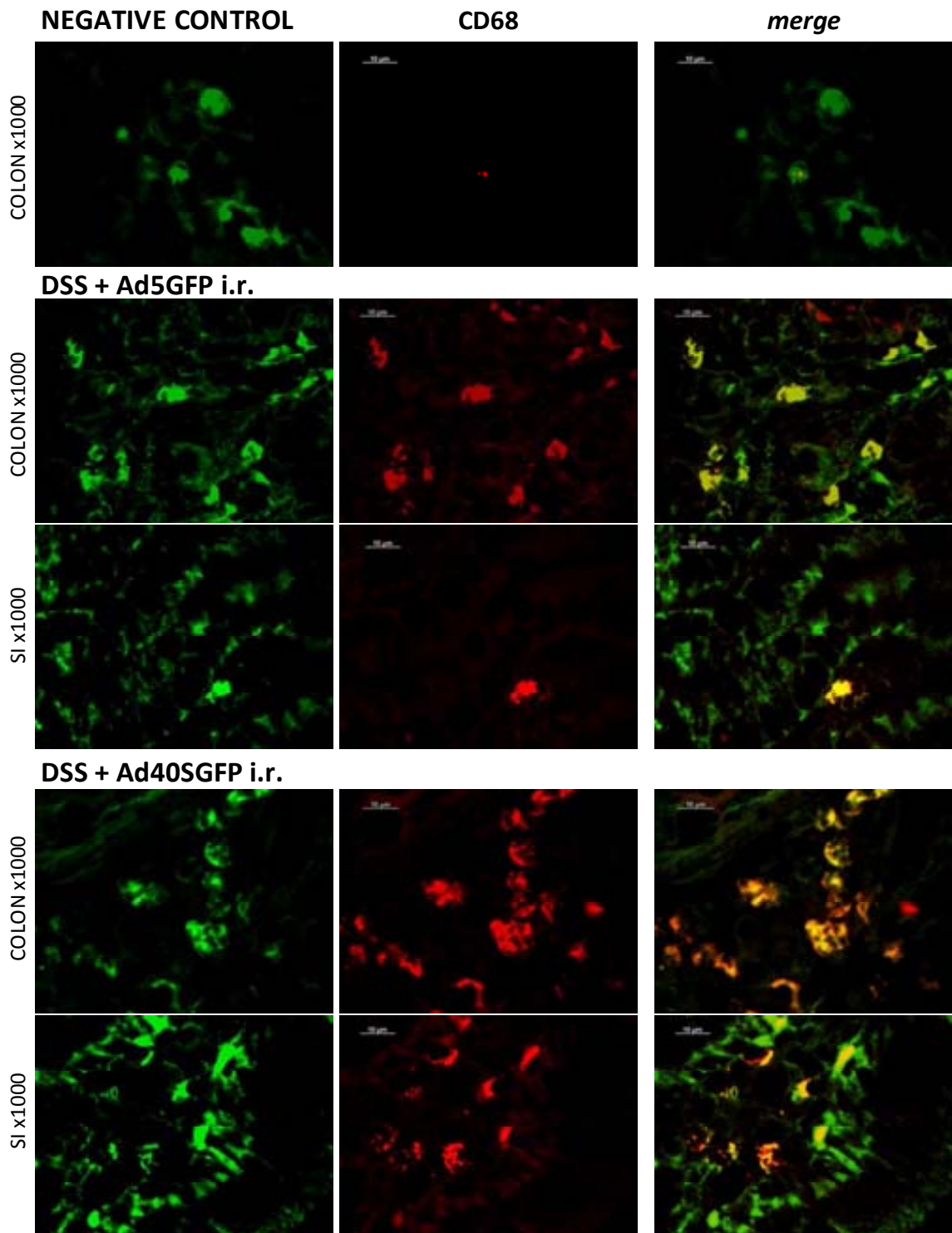


FIGURE 7: CD68 immunohistochemical analysis of intestinal sections of CD1 colitic female mice receiving either Ad40SGFF i.r. or Ad5GFP i.r. Images show transduced cells within the intestinal tract (*in green*) and co-localization (*in yellow*) of some cells with CD68 positive cells (*in red*). *SI*, small intestine.

Biosafety and biodistribution pattern of chimeric adenovirus in colitic animals

As shown in **figure 8**, administration of the chimeric adenoviruses did not alter the natural course of DSS colitis. No mortality was recorded in any of the colitic groups and no unexpected alterations were registered, suggesting that these chimeric Ads are well tolerated upon rectal administration, even in colitic animals.

Figures **8A**, **8B** and **8C** illustrate the body weight change and the DAI in healthy and colitic mice. Regardless of the Ad administered animals lost body weight upon DSS consumption. Daily drinking volume did not differ significantly between the DSS-treated groups (*data not shown*).

Figure **8E** illustrates the ratio colon weight/length, a reliable index of colitis since colitic mice suffer a significant colon shortening (**fig. 8D**) and a thickening of the intestinal wall as colitis progresses. This ratio was increased in all colitic groups. Colonic tissue of colitic mice exhibited increased MPO activity when compared to tissue taken from healthy animals (**fig. 8F**).

Figures 5B, 6B and 7 show micrographs of the gastrointestinal tract of colitic mice in which transduction with Ad40S seems to be slightly increased when compared to healthy mice (**figures 5A and 6A**). Enhanced green fluorescence was observed in inflamed colonic mucosa, probably due to a higher efficiency of viral transduction of epithelial cells when colonic mucosa is damaged. GFP+ cells were located in *villi* and crypts as well as in the submucosa of stomach (not shown), ileum and colon of Ad40SGFP colitic mice administered by either oral or intrarectal routes. In colitic tissues, a hyperplasia of enteroendocrine cells was also evidenced, as shown by the apparent increase in chromogranin A immunoreactivity (fig. 5B *versus* 5A). The opposite was found for somatostatin-positive cells, which seemed to be slightly decreased in colitic *versus* healthy tissues (fig. 6B *versus* 6A).

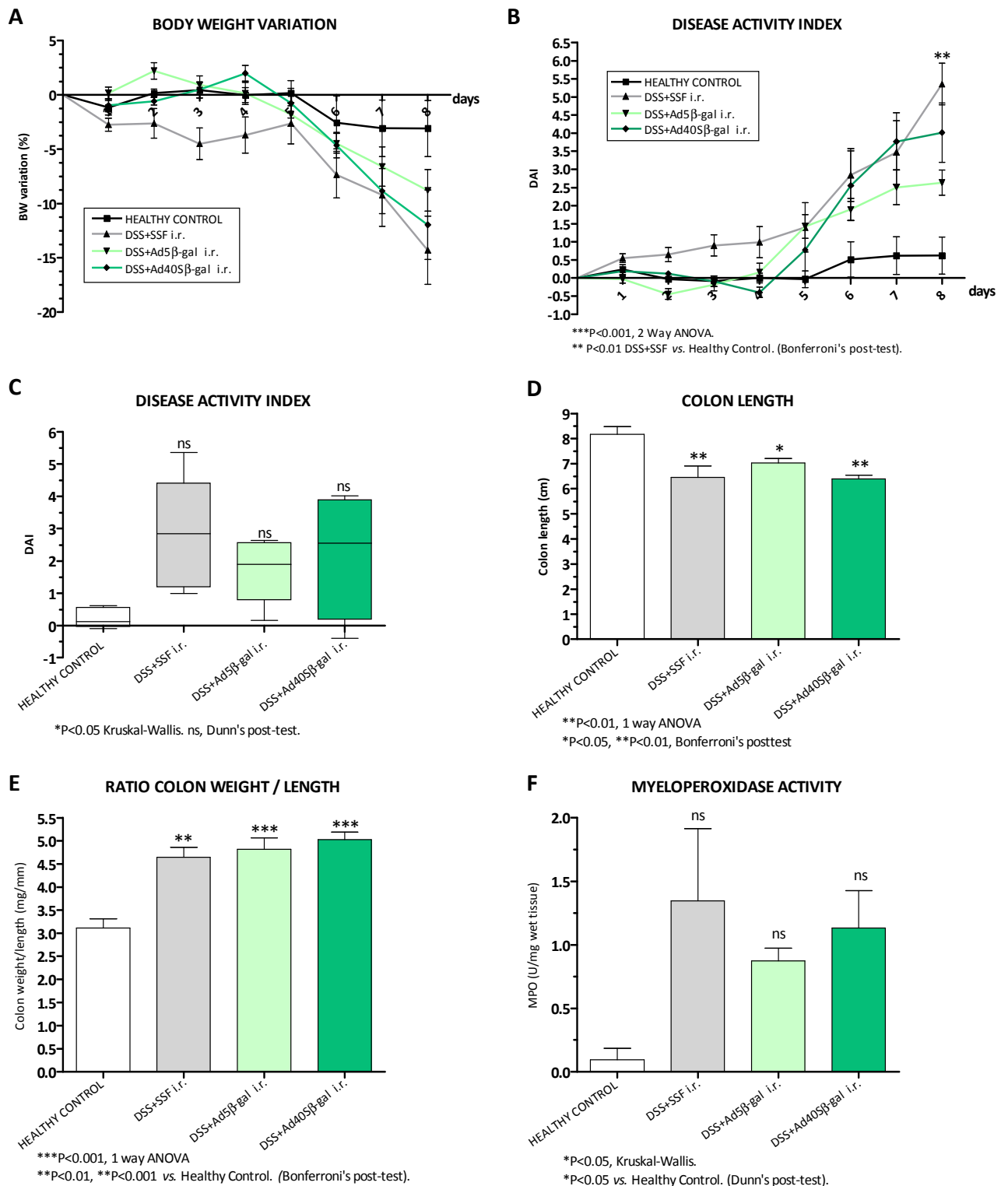


FIGURE 8: Intrarectal administration of SSF, Ad5GFP or Ad40SGFP to CD1 colitic female mice. Administration of 4% DSS during 5 consecutive days ensures the instauration of a moderate colitis in this strain of mice.

A) BODY WEIGHT CHANGE (%) compared with the initial day of the experiment in healthy mice and during administration of 4% DSS (5 days) +/- SSF, Ad5GFP or Ad40SGFP i.r. **B) DISEASE ACTIVITY INDEX.** Daily mean values. **C) DISEASE ACTIVITY INDEX.** Mean values per group in 8 day period. **D) COLON LENGTH.** Mean values (cm) at endpoint (8 days) per group. **E) RATIO COLON WEIGHT/LENGTH.** Mean values (mg/mm) at endpoint (8 days) per group. **F) MPO ACTIVITY (U/mg wet tissue).** Mean values at endpoint (8 days) per group.

Microbiological control studies in tissues of healthy and colitic mice

Figure 9 depicts β -galactosidase activity versus microbial counts ($\log CFU/100 \mu L$) in homogenates of liver and gastrointestinal tissues of untreated healthy and colitic mice. In homogenates from healthy animals, β -gal activity was low and unrelated with presence of bacteria. In contrast, in homogenates of colitic animal tissues, β -gal activity was eventually high, in some instances related to bacterial counts. Sonication of the homogenates reduced bacterial counts to some extent, but residual β -gal activity was still higher in homogenates of colitic compared to healthy mouse tissues.

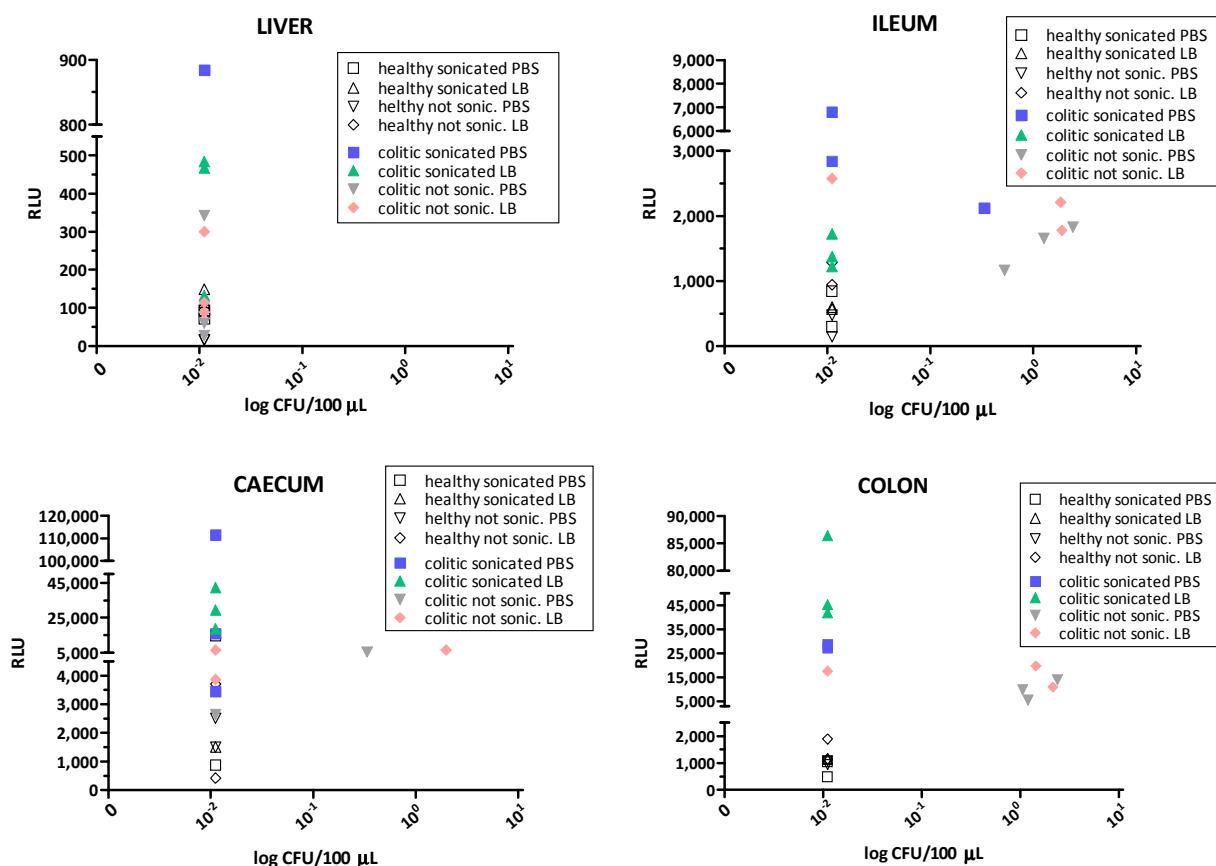


FIGURE 9: Microbiological counts ($\log CFU/100 \mu L$) and luminometry (*relative luminescent units, RLU*) of samples of healthy and colitic mice (4% DSS, 5d). Graphs show four groups of samples of liver, ileum, caecum and colon sonicated and not sonicated, and diluted in PBS 1X or Lysis Buffer (LB).

Figure 10 shows cultures of tissue homogenates of colitic mice in agar MacConkey medium. Microbial cultures corresponding to healthy mice displayed a much lower bacterial growth when compared to colitic mice; importantly, any of these bacteria was β -gal positive. Conversely, in samples of colitic mice a mild β -gal positive bacterial growth was evidenced. After sonication or in the presence of Lysis Buffer (*right panels*) bacterial growth was markedly reduced when compared to not sonicated - PBS processed samples (*left panels*). However, luminometric analysis yielded still high values, probably due to the presence of β -galactosidase from lysed bacteria. The β -gal negative bacterial growth found

in sonicated PBS liver samples (considered a sterile tissue under a healthy status) may reflect bacterial translocation due to colitis or an accidental contamination during sample processing.

Thus, the use of sonication and lysis Buffer for luminometric sample processing though actually resulted in a marked decrease in bacterial counts, did not eliminate the bias caused by the residual β -galactosidase from adherent or translocated bacteria in colitic tissue.

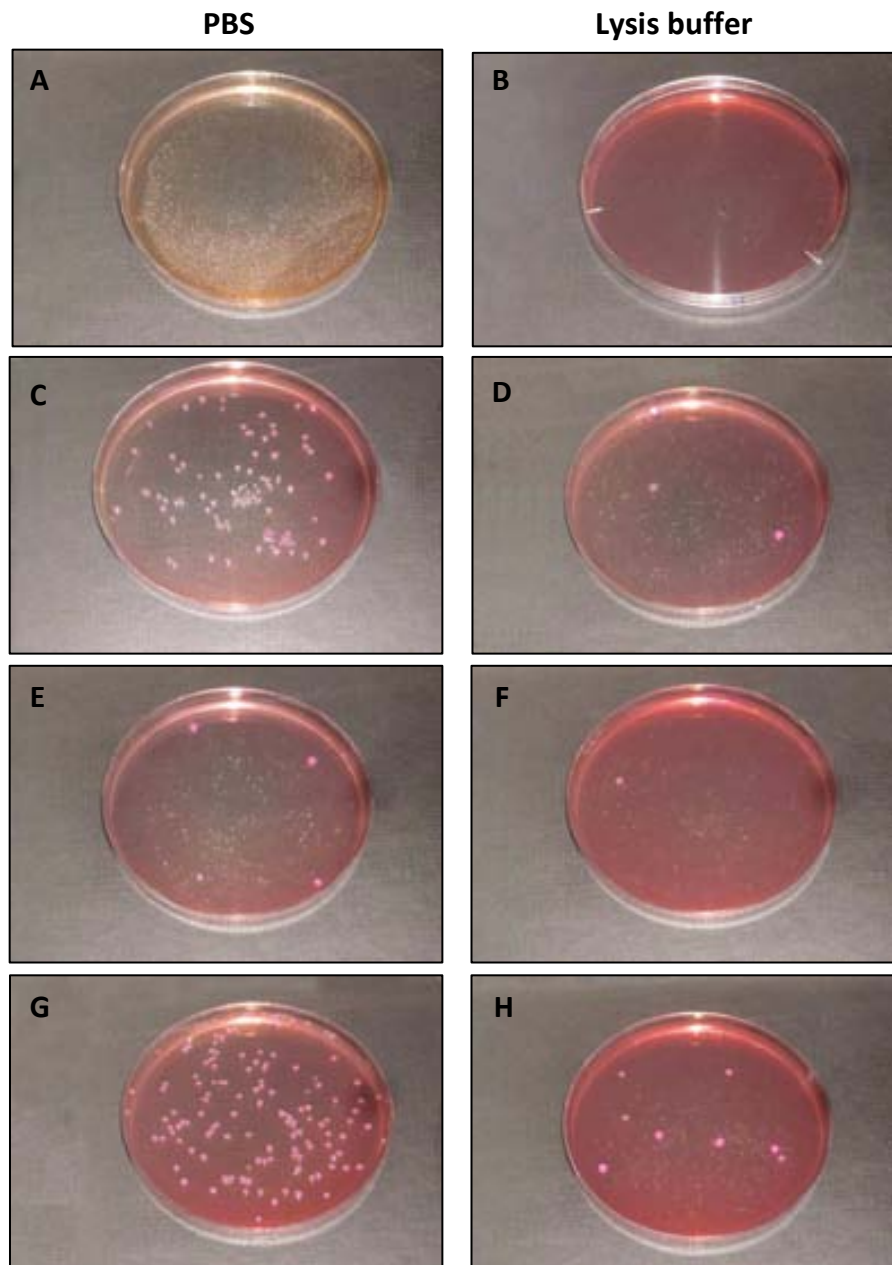


FIGURE 10: Agar MacCONKEY cultures of tissue homogenates of colitic mice (4% DSS, 5d).

A) Liver 1P, **B)** Liver 1L, **C)** Small Intestine 2P, **D)** Small Intestine 2L, **E)** Caecum 2P, **F)** Caecum 2L, **G)** Colon 2P, **H)** Colon 2L. **LEGEND:** **1:** sonicated, **2:** not sonicated, **L:** Lysis Buffer, **P:** PBS 1x.

Left and right panels are PBS- and Lysis buffer- processed samples, respectively. Images demonstrate a lower bacterial growth in small intestine, caecum and colon samples processed with Lysis Buffer when compared to PBS samples. Beta-gal positive bacterial colonies exhibit a bright pink color and no change in MK's dye. Agar MK color turns from red to yellowish when there is a significant β -gal negative bacterial growth (fig 10A). No bacterial growth was detected in sonicated homogenates processed with lysis buffer.

DISCUSSION

Gene therapy of intestinal diseases is hampered by the lack of vectors with intestinal tropism. Most adenoviruses, and indeed the classical Ad5, bind to surface integrins ($\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$) and gain entry by receptor mediated endocytosis using CAR for their attachment [19, 20]. CAR mRNA can be detected in human intestinal tissues by northern blotting [8], though recent research has demonstrated that it is not expressed in the brush border of polarized epithelial cells [13, 14]. Since CAR expression is rather restricted to the basolateral space, direct access for Ad through CAR is normally hindered in healthy tissue.

In contrast to Ad5, Ad40 and other human adenoviruses, are missing RGD motifs (Arg-Gly-Asp) in the penton base, suggesting an α_v -integrin-independent entry or interaction of the virus with other cell surface molecules [16]. Instead, Ad40 bears the RGAD motif (Arg-Gly-Ala-Asp) in the penton base, a motif which interacts with different $\alpha_v\beta$ integrins. The discovery that the short Ad40 fiber (F40S) does not bind to CAR [9] has favored the design of the chimeric Ad5/40S (*i.e.*, Ad40S, Ad5 virion that encodes the F40S -short- fiber) that might enter epithelial cells independently of CAR recognition and be thus useful for intestinal gene therapy.

Our results demonstrate for the first time that introducing the F40S in the construct of chimeric Ad5/40S reduces the natural hepatic tropism of Ad5, favoring the biodistribution of the resulting chimeric Ad5/40S to the colon after its oral or rectal administration. Ad5 does not bind efficiently to differentiated enterocytes [15, 16, 21]. In agreement with this, our results demonstrate scarce intestinal transduction with the Ad5 by the three routes tested, and a better efficiency of transduction to the gastrointestinal tract with the chimeric Ad40S, as demonstrated by luminometry, immunohistochemistry and immunofluorescence.

Although rectal administration of recombinant adenoviral vectors predominantly targets colonic epithelial cells, some expression has been reported in *lamina propria* mononuclear cells [21]. Biodistribution studies of chimeric adenoviruses in healthy CD1 mice allowed us to confirm transduction both in small and large intestine, in mucosal IECs with some staining also in the submucosa and *lamina propria* apparently associated to resident leukocytes.

To further characterize the cell types transduced with the Ad40S, we performed co-localization studies employing enteroendocrine cell markers. Since chromogranins (A, B, and C) are major components of dense core granules of neuroendocrine cells and sympathetic nerves, anti-ChrA antibodies were used to stain endocrine cells of the gastrointestinal tract [22, 23]. In addition we used anti-somatostatin antibodies since somatostatin is one of the more widely distributed hormones in the gastrointestinal tract [24]. We found indeed a high degree of co-localization of Chr-A and somatostatin in Ad40S transduced (*i.e.*, GFP+) cells.

When it comes to colitic tissue, we found an increased Chr-A immunoreactivity (figs. 5B *versus* 5A) in agreement with the reported enteroendocrine cell hyperplasia in intestinal tissues of IBD patients [25]. Instead, somatostatin-containing endocrine cells are decreased in IBD [24]; this may explain the apparent reduction in the number of somatostatin-positive cells in intestinal tissues of colitic mice (fig. 6B *versus* 6A).

The finding of a preferential transduction of enteroendocrine cells is of great relevance, considering that the lifespan of these cells is longer than the three-day turnover estimated for IECs. This might allow a longer transgene expression, and also other advantages such as the preferential secretion of their products to the submucosal space. Thus, secretion of immunoregulatory transgene products might elicit significant regulatory effects on the macrophages and infiltrating cells of this *milieu*, particularly compared to the putative effects that would follow its luminal secretion.

Some GFP+ cells were also stained with anti-CD68 antibodies. CD68 is found on the surface of macrophages, and to a lesser extent in monocytes, neutrophils and basophils, and has been recommended as a marker of resident colonic macrophages [26]. Thus, colocalization of GFP and CD68 might suggest engulfment of debris from dead transduced cells by phagocytes. Alternatively, it may suggest that some resident leukocytes may be transduced with this vector. We are now undertaking additional studies to ascertain to what extent the fluorescence found in phagocytic cells in the submucosal layers is due to a direct transduction of such phagocytes or if the presence of GFP might be due to epithelial debris taken up by such cells.

Our biosafety studies indicate that none of the chimeric adenoviruses studied nor the classic Ad5 caused significant toxic effects to healthy or colitic mice. The fact that they can transduce the intestine after oral or intrarectal administration may also provide other advantages, such as a lower immune stimulation compared to systemic administration. As shown in chapter 1, systemic administration can result in delayed toxicity in an inflammatory context. The enteric administration of the Ad5/40S might thus overcome this toxicity.

To assess the influence of epithelial erosion caused by colitis in the Ad transduction efficacy we performed the same biosafety and biodistribution experiments including luminometric and immunofluorescence analysis in colitic mice (4% DSS, 5d). In this paradigm the major finding is the increased transduction achieved when the epithelium is disrupted. Immunofluorescence images of colitic animals administered with Ad40SGFP, either orally or rectally, showed an apparent increase in cell transduction compared to healthy mice as previously reported by other authors [21, 27]. Epithelial sloughing during colitis may favor adenoviral access into cells, particularly at the mucosal and submucosal levels, therefore yielding higher efficiency of transduction. It is possible that basolateral membrane CAR might in such condition play a role and enable CAR-mediated internalization in addition to the CAR-independent internalization seen when the epithelium is intact. This

might be relevant for the putative use of these adenoviral vectors in intestinal inflammatory conditions.

In order to confirm that the β -galactosidase stain evidenced in immunohistochemical and luminometry studies is not due to microbiota-borne β -gal activity we performed microbiological control studies in which four samples of control healthy and control colitic mice (4% DSS, 5d) were analyzed. These studies were also intended to assess to what extent treatment of homogenates with sonication or with lysis buffer might reduce the artifactual β -gal activity.

Images of microbial cultures show that β -gal+ *Enterobacteriaceae* only grew in samples mechanically homogenized diluted in PBS and to a lesser extent in lysis buffer. No β -gal+ bacterial growth was evidenced either in any sample of healthy mice or in sonicated samples of either healthy or colitic mice indicating that sonication exerts the expected bacteriolytic effect. The lysis buffer employed has also shown to enhance this bacteriolytic effect, as evidenced by the lower β -gal positive bacterial growth obtained with lysis buffer as diluent (*figure 10, right panels*) when compared to PBS (*figure 10, left panels*). Nevertheless, in tissue from colitic controls bacteria may access the submucosal space and translocate to lymph-nodes, spleen and liver [28, 29]. This probably accounts for the observed bacterial overgrowth in liver of DSS colitic mice (*fig 11A*) and for the β -gal activity detected by luminometry despite the fact that the animals did not receive any β -gal-expressing vector.

We are now setting a real time RT-PCR technique to quantify GFP. This method should allow the unequivocal quantification of colonic transduction in colitic mice receiving Ad40SGFP *versus* that of healthy mice.

This study characterizes for the first time the biodistribution and biosafety of a group of chimeric adenoviruses Ad5/40 both in healthy and colitic mice. Efforts made towards the characterization of the cell types transduced *in vivo* suggest marked differences of Ad40S compared to the rest of adenoviruses studied and delineate an interesting biodistribution profile for such vector, which might be useful for gene therapy of gastrointestinal diseases, transducing specifically colonic cells with high efficiency. The fact that Ad5/40S was more resistant to acid exposure and showed increased infective capacity on HEK293 cells (*data not shown*) suggests that passage through the stomach could result in an improved infectivity. For this reasons, among the vectors studied, Ad5/40S can be proposed as a vector of choice to treat gastrointestinal diseases by the oral or rectal routes.

REFERENCES

1. Kitten O, Cosset FL, Ferry N. Highly efficient retrovirus-mediated gene transfer into rat hepatocytes in vivo. *Hum Gene Ther* 1997;8:1491-4.
2. Jaffe HA, Danel C, Longenecker G, et al. Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat liver. *Nat Genet* 1992;1:372-8.
3. Li Q, Kay MA, Finegold M, Stratford-Perricaudet LD, Woo SL. Assessment of recombinant adenoviral vectors for hepatic gene therapy. *Hum Gene Ther* 1993;4:403-9.
4. Ponnazhagan S, Mukherjee P, Yoder MC, et al. Adeno-associated virus 2-mediated gene transfer in vivo: organ-tropism and expression of transduced sequences in mice. *Gene* 1997;190:203-10.
5. Ponnazhagan S, Yoder MC, Srivastava A. Adeno-associated virus type 2-mediated transduction of murine hematopoietic cells with long-term repopulating ability and sustained expression of a human globin gene in vivo. *J Virol* 1997;71:3098-104.
6. Wolfe D, Niranjana A, Trichel A, et al. Safety and biodistribution studies of an HSV multigene vector following intracranial delivery to non-human primates. *Gene Ther* 2004;11:1675-84.
7. Sharma A, Li X, Bangari DS, Mittal SK. Adenovirus receptors and their implications in gene delivery. *Virus Res* 2009;143:184-94.
8. Tomko RP, Xu R, Philipson L. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3352-6.
9. Nakamura T, Sato K, Hamada H. Reduction of natural adenovirus tropism to the liver by both ablation of fiber-coxsackievirus and adenovirus receptor interaction and use of replaceable short fiber. *J Virol* 2003;77:2512-21.
10. Arnberg N. Adenovirus receptors: implications for tropism, treatment and targeting. *Rev Med Virol* 2009;19:165-78.
11. Cotter MJ, Zaiss AK, Muruve DA. Neutrophils interact with adenovirus vectors via Fc receptors and complement receptor 1. *J Virol* 2005;79:14622-31.
12. Kalyuzhniy O, Di Paolo NC, Silvestry M, et al. Adenovirus serotype 5 hexon is critical for virus infection of hepatocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:5483-8.
13. Walters RW, Freimuth P, Moninger TO, Ganske I, Zabner J, Welsh MJ. Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell* 2002;110:789-99.
14. Chen Z, Ahonen M, Hamalainen H, Bergelson JM, Kahari VM, Lahesmaa R. High-efficiency gene transfer to primary T lymphocytes by recombinant adenovirus vectors. *J Immunol Methods* 2002;260:79-89.
15. Croyle MA, Stone M, Amidon GL, Roessler BJ. In vitro and in vivo assessment of adenovirus 41 as a vector for gene delivery to the intestine. *Gene Ther* 1998;5:645-54.
16. Walter E, Croyle MA, Roessler BJ, Amidon GL. The absence of accessible vitronectin receptors in differentiated tissue hinders adenoviral-mediated gene transfer to the intestinal epithelium in vitro. *Pharm Res* 1997;14:1216-22.
17. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993;69:238-49.
18. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 1984;87:1344-50.
19. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, et al. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997;275:1320-3.
20. Einfeld DA, Schroeder R, Roelvink PW, et al. Reducing the native tropism of adenovirus vectors requires removal of both CAR and integrin interactions. *J Virol* 2001;75:11284-91.
21. Wirtz S, Galle PR, Neurath MF. Efficient gene delivery to the inflamed colon by local administration of recombinant adenoviruses with normal or modified fibre structure. *Gut* 1999;44:800-7.
22. Bargsten G, Grube D. Serotonin storage and chromogranins: an experimental study in rat

- gastric endocrine cells. *J Histochem Cytochem* 1992;40:1147-55.
23. Sciola V, Massironi S, Conte D, et al. Plasma chromogranin a in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:867-71.
24. Watanabe T, Kubota Y, Sawada T, Muto T. Distribution and quantification of somatostatin in inflammatory disease. *Dis Colon Rectum* 1992;35:488-94.
25. Le MF, Bost F, Peoc'h M, Roux JJ, Pasquier D, Pasquier B. Carcinoid tumour complicating inflammatory bowel disease. A study of two cases with review of the literature. *Pathol Res Pract* 1994;190:1185-92.
26. Rogler G, Hausmann M, Vogl D, et al. Isolation and phenotypic characterization of colonic macrophages. *Clin Exp Immunol* 1998;112:205-15.
27. Wirtz S, Neurath MF. Gene transfer approaches for the treatment of inflammatory bowel disease. *Gene Ther* 2003;10:854-60.
28. Osman N, Adawi D, Ahrne S, Jeppsson B, Molin G. Modulation of the effect of dextran sulfate sodium-induced acute colitis by the administration of different probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Dig Dis Sci* 2004;49:320-7.
29. Gardiner KR, Erwin PJ, Anderson NH, Barr JG, Halliday MI, Rowlands BJ. Colonic bacteria and bacterial translocation in experimental colitis. *Br J Surg* 1993;80:512-6.

¿Qué valor terapéutico tiene sobre modelos de IBD la silenciación de TNF α mediante siRNA's administrados localmente en el colon?



Capítulo 4

Functionally enhanced siRNA targeting TNF α attenuates DSS-induced colitis and reduces TLR-mediated immunostimulation

(Patent number P201031622, 4 November 2010)

(Submitted manuscript to Molecular Therapy)

FUNCTIONALLY ENHANCED siRNA TARGETING TNF α ATTENUATES DSS-INDUCED COLITIS AND REDUCES TLR-MEDIATED IMMUNOSTIMULATION

ABSTRACT

BACKGROUND: Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α) is a pro-inflammatory cytokine known to play a central role in the development and exacerbation of IBD. Current treatments targeting this cytokine include the use of monoclonal, humanized antibodies which show a relative efficacy but are not devoid of side effects. The use of antisense oligonucleotides and short interference RNAs (siRNAs) to drive down TNF α expression at the site of inflammation might provide several advantages.

AIM: In this study we have explored the therapeutic potential of native (unmodified) and chemically modified TNF α silencing oligonucleotides (siRNAs) in a murine model of IBD (DSS-induced colitis).

METHODS and RESULTS: Colitis was induced in mice by addition of 5% DSS in the drinking water for 5 consecutive days. Therapeutic efficacy was studied after local (intrarectal) administration of these siRNAs against TNF α , complexed with cationic lipids, 2 and 4 days after induction of colitis. A significant reduction of the disease activity index, the colon shortening, the weight/length colon ratio, the myeloperoxidase activity and the histological score was achieved with siTNF78 (a 2'-O-methyl and propanediol modified siRNA TNF α duplex) at endpoints (5 and 8 days post-induction of colitis). TNF α mRNA in colon supernatants was significantly reduced three days after a single intrarectal siTNF78 administration. A gene array study was then performed on treated colon epithelia in order to gain insight into the mechanism by which siTNF78 might ameliorate the clinical endpoints of disease. Gene expression analysis correlated with improved colon integrity and reduced TLR activation, demonstrating absence of off-target effects, a down-regulation of inflammatory and innate immunity genes, as well as a genetic profile similar to that of healthy controls.

CONCLUSION: This study is the first to demonstrate a phenotypic amelioration with the local mucosal delivery of a specialized chemical modification introduced into siTNF78, which was further supported by quantitative evidence of decreased TNF α mRNA levels in colon tissue. Liposomal siTNF78 proved nontoxic, did not elicit an unspecific interferon response and provide a means for genetic engineering of a new mucosal drug for *in vivo* applications.

INTRODUCTION

Chronic inflammatory bowel disease (IBD), mainly ulcerative colitis and Crohn's disease are inflammatory conditions affecting the gastrointestinal tract. Although their precise aetiology and pathophysiology are not completely understood, clinical and experimental evidences suggest that IBD is driven by a seemingly enhanced immune response towards the intestinal microflora in genetically predisposed individuals, with loss of immunological tolerance [1], unspecific and uncontrolled activation of immune cells and the production of increased amounts of several proinflammatory cytokines such as TNF α , IL-1 β , IL-6 and IFN- γ by immunocytes and intestinal epithelial cells (IECs) [2]. This in turn causes the recruitment of more immunocompetent cells and the amplification of the inflammatory response. TNF α has been strongly linked to the pathology associated to experimental colitis and IBD [3] due to its capacity to increase its own expression, as well as that of other proinflammatory molecules in T cells, macrophages and mucosal cells [4-8]. Indeed, TNF α levels are increased in both serum and mucosa of IBD patients [9-12]. Several experimental studies of IBD (TNBS- and DSS-induced colitis) have also shown significantly increased TNF α levels [13, 14]. Moreover, transgenic animals over-expressing TNF α exhibit an exacerbated response to the chemical compounds used to induce intestinal inflammation [14] and inhibition of this cytokine has proven to be effective in the amelioration and/or prevention of colitis in such animal models [14-17].

In vitro studies have demonstrated that several cell types including enterocytes are capable of releasing TNF α and other cytokines in response to appropriated stimuli [18, 19]. TNF α has shown to alter the so-called barrier function and to increase mucosal permeability which may favour diffusion of luminal antigens to the submucosal space and eventually facilitate bacterial translocation [20, 21]. Since IECs are not passive elements in this process and may secrete cytokines, present antigens and modify the expression of proteins related to tight junction structure and function [22-26] they are putative targets of anti-inflammatory therapy.

In the past years, a series of biological therapies addressed to block TNF α have been used in the treatment of IBD and other inflammatory diseases. Among them, anti-TNF α antibodies such as infliximab or adalimumab [27-31] have been employed to treat IBD and other chronic inflammatory conditions with relative success. Infliximab has proven to be efficacious against arthritis and relatively efficacious against IBD in clinical trials [30]. A major concern linked to systemic suppression of TNF α -effects is the reduced capacity of the patient to react against intracellular pathogens. The generation of anti-infliximab antibodies causing undesirable immune responses such as lupoid reactions, is another serious side effect [27, 32-34]. An association of infliximab therapy with the development of lymphoma has also been suggested in clinical trials [35]. However, TNF α blockade has allowed for consistent benefits in arthritis and IBD clinical experience. Therefore, it is crucial to decrease

the adverse effects with strategies such as local delivery and organ-selective blockade of TNF α to improve these anti-TNF α therapies. The use of antisense oligonucleotides to inhibit TNF α is among the most innovative therapeutic strategies and has proven to be effective in animal models [15, 36]. Other antisense strategies approaching different molecular targets are already in clinical trials [37, 38].

RNA interference (RNAi) refers to post-transcriptional gene silencing mediated by single- or double-stranded RNAs [39]. RNAi can be mainly achieved in mammalian cell cultures through either liposomal transfection or by preformed short interfering RNAs (siRNAs) [40-42]. This procedure has been widely used *in vitro* but its use *in vivo* as a therapeutic intervention strategy has not received much attention [43, 44] due to the inherent instability of the RNA moiety [45]. Recently, Palliser *et al.* [46] demonstrated that the vaginal administration of siRNA targeting viral factors led to protection against lethal infection with sexually transmitted viruses in mice. In view of the promising results of this new technology, several biotechnology companies are nowadays exploring the applicability of siRNA molecules in clinical trials (*e.g.*, ToleroVaxT, from ToleroTech Inc., a siRNA specific for the IL-12 p35 subunit, which induces immune shift from T_H1 to T_H2 responses).

The aim of this study was to assess the silencing efficacy of several siRNA TNF α molecules bearing chemical modifications intended to increase their stability. The siRNA molecules have been tested *in vitro*. In addition we have tested such siRNAs in the murine DSS-colitis model to ascertain whether specific TNF α silencing correlates with the phenotypic changes observed in the model of colitis.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of chemically modified siRNAs

Several siRNA molecules targeting the murine TNF α gene were tested in DSS-colitic mice. The siRNA TNF α and scramble (scr-OMe) sequences were obtained from Sigma-Proligo, Dharmacon (St. Louis). siRNA molecules were as follows:

siRNA TNF α unmodified (*siTNF*): sense strand 5'-GUGCCUAUGUCUCAGCCUC-dT-dT-3' and antisense strand 5'-GAGGCUGAGACAUAGGCAC-dT-dT-3'.

siRNA TNF α 2'-O-methyl (*siTNF-OMe*): the same TNF α sequence described above with two 2'-O-methyl-RNA modifications (mG= 2'-O-methyl-G and mU= 2'-O-methyl-U) in the 5' overhang of the sense strand.

siRNA TNF α 2'-O-methyl / propanediol (*siTNF78*): This siRNA molecule was synthesized at Dr. Ramón Eritja's lab (Institute for Research in Biomedicine, IRB Barcelona, Spain) with the same TNF α sequence described above. The sense strand was modified at the 5' overhang (mG= 2'-O-methyl-G and mU= 2'-O-methyl-U) and at the 3' overhang with a propanediol group, CH₂ (CH₂OH)₂, as described by *Aviñó et al. [47]*, resulting in a 5'(mG)(mU)GCCUAUGUCUCAGCCUC-dT-dT-propanediol-3' sense strand sequence.

The anti-TNF α siRNA has previously been shown to efficiently downregulate murine TNF α mRNA [48].

siRNA scramble OMe (*siScr-OMe*): a siRNA duplex scrambled as negative control sequence with two 2'-O-methyl-RNA modifications (mC= 2'-O-methyl-C and mA= 2'-O-methyl-A) in the 5' overhang of the sense strand. Sense scrambled strand 5'-mCmAGUCGCGUUUGCGACUGG-dT-dT-3' and antisense scrambled strand 5'-CCAGUCGCAAACGCGACUG-dT-dT-3'[†].

Silencing ability in vitro

HeLa (human cervical adenocarcinoma epithelial cells, ATCC # CCL-2™) and murine 4T1 (murine breast carcinoma cells, ATCC # CRL-2539™) cells were cultured under standard conditions in supplemented Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco®).

Since HeLa cells do not express the murine TNF α gene, co-transfection with the corresponding plasmid was needed: 250 ng of murine TNF α expressing plasmid using lipofectin® (Invitrogen, CA, USA) as co-transfection reagent were added, following the manufacturer's instructions. One hour after transfection, murine TNF α -expressing HeLa cells were transfected with each siRNA TNF α duplex (50 nM or 100 nM) with and without oligofectamine® (Invitrogen, CA, USA) as recommended transfection reagent for eukaryotic cells.

For 4T1 cells, 100 nM of each siRNA TNF α duplex was incubated with oligofectamine® before siRNA transfection.

[†] RNA monomers in capital letters: **dT**, 2'-deoxythymidine; **mA**, methyl adenosine; **mC**, methyl cytidine; **mG**, methyl guanosine and **mU**, methyl uridine.

After 24h (4T1) or 48h (HeLa), TNF α production was measured in cell culture supernatants by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Bender MedSystems).

Isolation of murine peritoneal macrophages

Peritoneal macrophages were collected from euthanized untreated mice. Animals were injected with supplemented DMEM (FBS + 1% Pen/Strept + glutamine) into their peritoneum, prior to fluid recollection. Peritoneal macrophages (10^4 cells/well) were transfected with siRNAs using DOTAP (Cat# 11202375001, Roche) following the manufacturer's instructions. Twenty hours after transfection, cells were stimulated with LPS (10 ng/mL) and TNF α secretion was measured by ELISA (Bender MedSystems) 10 hours later.

Animals

C57BL/6 healthy female mice (10 weeks old, 18-20 g body weight) purchased from HARLAN (Holland), were kept under specific pathogen free conditions in a protected autonomous unit throughout the experimental period, with free access to food (A04 chow, PanLab) and water, and with a light/dark cycle of 12h/12h, under standard conditions (22°C, 70-80% relative humidity). All the experiments were approved by the Ethical Committee and the Biosafety Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona.

DSS-induced colitis and clinical evaluation

To induce colitis mice received 5% dextran sulphate sodium salt (DSS, MP Biomedicals; MW 36-50 kD) in their drinking water for five consecutive days (*ad libitum*). Fresh DSS solution was prepared on alternate days. Our previous work has demonstrated that with this DSS regime a severe colitis is established with weight loss, rectal mucus discharge, diarrhea, bloody feces and changes in animal's aspect and behaviour. Mice were examined daily to evaluate water/DSS and food consumption. In all animals receiving DSS, weight loss, stool consistency, fecal blood and animal aspect were determined each day to assign an individual disease activity index (DAI) as described previously [49]. DAI was determined by combining scores of *a) weight loss* (0-4 points), *b) stool score* (0-4 points), *c) animal aspect* (0-3 points) and *d) blood in feces* (0-3 points). Total DAI score was the sum of these parameters, ranging from 0 (unaffected) to 14 (highly severe colitis). A total of 172 mice were used in this study. See **table 1** for a detailed explanation.

siRNA treatment protocol

To create lipoplex siRNA preparations, 2 μ L lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, CA, USA) -used as transfection reagent for *in vivo* studies- was mixed with 48 μ L OptiMEM® (Invitrogen, CA, USA) and incubated at room temperature for 5 min. This solution was then combined with 20 nmol siRNA resuspended in 50 μ L OptiMEM® and incubated at room temperature for 20-25 minutes. Twenty μ L of this liposomal solution was intrarectally administered (4 nmol/mouse) to anesthetized mice (Ketamine (Merial Labs) / Xilazine (Bayer); 55/15 mg/Kg diluted in saline; 10 mL/Kg, i.p. route). All siRNAs were administered twice (on days 2 and 4 post-induction of DSS colitis), except for mice euthanized on day 3 (only one siRNA administration 16 hours before euthanasia). See **figure A** for study design details. **Table 2** summarizes the number of animals employed for each experimental group.

BODY WEIGHT CHANGE		SCORE	STOOL SCORE		SCORE
< 0% (gain)		0	Normal		0
0-5% (loss)		1	Pasty feces		1
5-10% (loss)		2	Semi liquid feces, perianal dirt		2
10-15% (loss)		3	Aqueous feces, dirty / wet tail		3
>15% (loss)		4	Very aqueous, dirty / wet tail and back		4
ANIMAL ASPECT		SCORE	BLOODY FECES		SCORE
Normal		0	Semi-quantitative evaluation depending on the quantity of blood observed.		0-3
Coarse hair		1			
Coarse hair and abnormal activity		2			
Obvious dehydration		3			
ENDPOINT CRITERIA		SCORE	A score of 3 in two out of the three parameters analyzed was taken as endpoint criteria.		
Body Weight (Morton & Griffiths)		0-3			
Aspect (Morton & Griffiths)		0-3			
Behaviour: very aggressive or comatose?		Yes = 3 No = 0			

TABLE 1: Parameters and scores related with the DAI and the endpoint criteria calculation. Morton DB and Griffiths PH, Vet Rec. 1985;116(16):431-436.

GROUP	TREATMENT	# OF ANIMALS (d3 + d5 + d8)	DILUTION / DOSE
Healthy controls	Lipofectamine 2000 + Optimem [®]	5 + 19 + 9	20 μ L/animal
5% DSS + siTNF	siRNA TNF α unmodified	0 + 14 + 8	4 nmol in 20 μ L/animal
5% DSS + siTNF-OMe	siRNA TNF α - OMe	0 + 16 + 8	4 nmol in 20 μ L/animal
5% DSS + siTNF78	siRNA TNF α - OMe/propanediol	5 + 25 + 12	4 nmol in 20 μ L/animal
5% DSS + siScr-OMe	siRNA scr-OMe	5 + 25 + 12	4 nmol in 20 μ L/animal

TABLE 2: Groups and number of animals employed, corresponding treatment and dose used at the different endpoints. Numbers indicate the number of animals employed in experiments at days 3, 5 and 8 respectively.

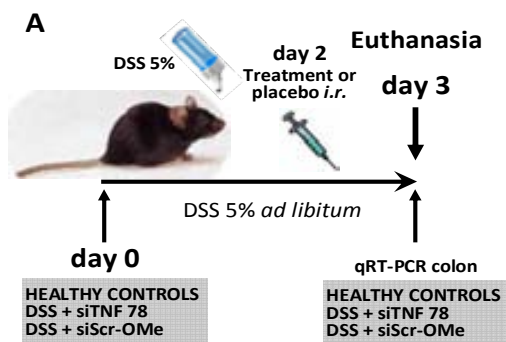
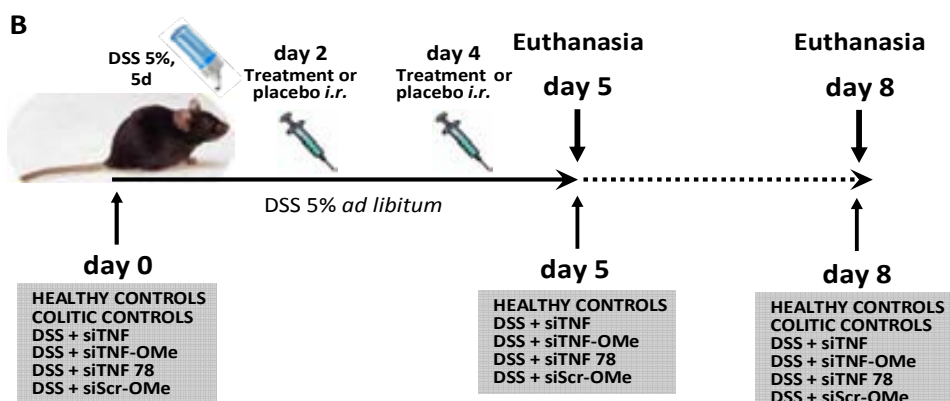


FIGURE A: Experimental design.

Colitis was induced in C57BL/6 female mice by addition of 5% DSS in the tap water (*ad libitum*). Several siRNA TNF α molecules were administered intrarectally.

A. siRNA was administered i.r. at day 2. Mice were euthanized 16 hours later (day 3 post-induction of colitis). **B.** siRNA was administered i.r. at days 2 and 4. Mice were euthanized either at day 5 or at day 8 post-induction of colitis.



Euthanasia and tissue collection

Mice were euthanized at 3, 5 and 8 days post-induction of colitis and sera were obtained from whole blood, collected by heart puncture performed under isoflurane (Isoba[®]vet, Shering-Plough) anaesthesia.

Gastrointestinal tissues were carefully rinsed with phosphate buffered saline (PBS) before collection to eliminate debris. Spleen, liver, caecum and colon were harvested and either fixed in 4% paraformaldehyde for histological analysis, frozen in liquid nitrogen for myeloperoxidase activity assay (colon) or kept in RNALater[®] reagent (AM7024, Ambion, Applied Biosystems) for real time RT-PCR (qRT-PCR) (colon). Livers and spleens were weighed, and colon length (from the colocecum junction to the rectum) and colon wet weight were measured.

Histological analysis

Sections of 3 μ m of liver, spleen, small intestine, colon and mesenteric lymph nodes were obtained from paraffin-embedded tissues. Histological assessment and scoring was performed by an investigator blinded to the study design on hematoxylin and eosin (H&E) stained sections. The Swiss-roll technique was employed to evaluate the severity of inflammation along the entire colon. Four segments of full-thickness colon sections were examined per mouse and given an histological score as described [50]. Four independent parameters were measured: severity of inflammation (0-3: none, slight, moderate, severe), extent (0-3: none, mucosa, mucosa and submucosa, transmural), crypt damage (0-4: none, basal 1/3 damaged, basal 2/3 damaged, only surface epithelium intact, entire crypt and epithelium lost) and regeneration (0-4: no tissue repair, surface epithelium not intact, regeneration with crypt depletion, almost complete regeneration, complete regeneration or normal tissue). The score of each parameter was multiplied by a factor reflecting the percentage of involvement (1-4: 1-25%, 26-50%, 51-75%, 76-100%), and the four resulting values were at least added. Thus, a total score for each mouse from 0 (no change in any segment) to 56 (maximal grade in all segments examined) was obtained. Scores <3 were considered to be normal basal inflammation. Liver, spleen and small intestine were also checked for the presence of any evidence of tissue damage.

Myeloperoxidase (MPO) activity

MPO activity has been widely used to determine the extent of cellular infiltration into inflamed tissues [51]. The activity of this enzyme was measured as previously described [51].

After flushing the colons thoroughly to remove the luminal contents, they were cut, weighed and frozen at -80°C until use. Segments of 50-70 mg of tissue (left longitudinal colon strip) were homogenized in 0.5% hexadecyltrimethyl ammonium bromide (HTAB, H9151, Sigma) in 50 mM phosphate buffer, pH 6.0 (1 mL/50 mg tissue) with a conic glass homogenizer (Potter), and centrifuged (4°C, 3000 xg , 10 min). MPO was assayed in the clear supernatant by adding 1 mg/mL of *o*-dianisidine dihydrochloride (Sigma, D3252) and H₂O₂ 1% (Sigma). The change in optical density was measured at 450 nm at 3 minute intervals (Plate reader TECAN Infinite F200). One MPO activity unit was defined as the amount of enzyme that degraded 1 μ mol of peroxide/min at 25°C. Results were expressed as U/mg wet tissue.

Real time RT-PCR (qRT-PCR) analysis

Colonic samples were harvested in RNeasy[®] lysis reagent (Qiagen) and immediately stored at -20°C until analysis.

Total RNA was extracted from circa 30 mg of distal colon from each mouse. Samples were homogenized using a Potter S (Bayer) on ice, applying two 10 sec pulses at 1500 rpm, in 600 μ L RLT buffer of the *RNeasy Mini kit* (Cat. # 74104, QIAGEN), following the manufacturer's guidelines. Spectrophotometric measurement of total RNA concentration (ng/ μ L) and purity was performed (NanoDrop[®], ND-1000 v3.3, at 260 nm) in 1 μ L of each sample supernatant. The RNA integrity number (RIN) was also determined for each sample in an electropherogram (Agilent Technologies, Inc.). Only high quality samples were employed.

One μ g of total RNA was reverse-transcribed into complementary DNA (cDNA) using the commercial kit *Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads* (code 27-9264-01, Amersham Biosciences) and the random (hexamer) primer pd(N)₆ (Amersham Biosciences), following the manufacturer's instructions. Experimental cDNA obtained is used as a mold for the real-time RT-PCR amplification.

Real-time PCR was performed on *Applied Biosystems Real-Time PCR System* using the comparative Ct (threshold cycle) quantitation method [52]. In this assay we employed TaqMan[®] probes (*Assay on Demand Gene Expression* commercial kits, Applied Biosystems) to detect the modulation of each messenger RNA (TNF α , Mm 00443258-m1; IFIT-1, Mm 00515153-m1 and IFN- β , Mm 00439552-s1), and the TaqMan[®] Universal Master Mix (Applied Biosystems). Data normalization was performed using GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, TaqMan[®] rodent GAPDH control reagents, Cat. # 4308313, Applied Biosystems) as housekeeping. Ct values of GAPDH were subtracted from Ct values of the target genes, obtaining Δ Ct values [Δ Ct = Ct test gene – Ct GAPDH]. Delta Ct values of treated mice were compared with Δ Ct values of untreated mice (healthy controls) resulting in the double delta Ct ($\Delta\Delta$ Ct) calculation: [$\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct experimental group - Δ Ct healthy control]. Values were calculated as fold increase relative to the control group (healthy controls) as follows: mRNA relative amount = $2^{(-\Delta\Delta$ Ct)}. All samples were run in duplicates. The average was then used to calculate the Ct value for each experimental sample as well as for the housekeeping gene (GAPDH). Results were expressed as relative units.

qRT-PCR was carried out in an *ABI Prism 7700 Sequence Detection System* (Applied Biosystems) and data were processed with the *Sequence Detector Software* (SDS 1.9, Applied Biosystems).

Measurement of TLR3, TLR7 and TLR8 activation: qRT-PCR IFN- β and IFIT-1 (IFN- α)

IFN- β mRNA (Applied Biosystems) was measured in distal colonic total RNA of siRNA-treated or untreated mice using qRT-PCR, normalized with GAPDH, as described in the previous paragraph. Results are expressed as IFN- β mRNA mean fold increase (\pm SEM) relative to the healthy control group (relative units).

IFIT-1 expression (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1, Applied Biosystems) was measured in distal colonic total RNA of the same siRNA-treated or untreated mice. IFIT-1 is the most strongly induced mRNA in response to type I IFN (IFN- α) [53]. mRNA IFIT-1 levels were quantified employing qRT-PCR, normalized with GAPDH, as

described previously. Results are expressed as IFIT-1 mRNA mean fold increase (\pm SEM) relative to the healthy control group (relative units).

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolation, culture and transfection with siRNAs

Human PBMCs were obtained by Ficoll-Hypaque density gradient [54]. Enriched monocyte populations were isolated by plastic adherence, seeded (5×10^4 cells/well) in a 96-well plate and maintained during 3 hours at 37°C. Non-adherent cells were removed. Finally, siRNA transfection was carried out following manufacturer's instructions (DOTAP protocol).

DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methylsulfate, Cat.# 11 202 375 001, Roche) was employed as liposomal reagent for siRNA cellular transfection. siRNAs were diluted in HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) saline buffer to a final concentration of 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and mixed carefully with DOTAP. Following an incubation period of 15 min at room temperature, the siRNA/DOTAP mix was added to the corresponding wells cultured with PBMCs. After an incubation period of 18-20 hours at 37°C, LPS was added to wells to a final concentration of 10 ng/mL. Ten hours later, culture supernatants were collected and TNF α secretion was assayed by ELISA (*see following paragraph*).

ELISA assay of murine TNF α and murine Serum Amyloid A (SAA)

Enzyme-linked immunosorbent assay was performed for quantitative detection of murine TNF α in serum samples and culture supernatants (Bender MedSystems, BMS607/2INST), following the manufacturer's guidelines. For quantitative detection of murine SAA, a major acute phase protein, in serum samples we used ELISA kits (Biosource, Invitrogen, KMA0011C) following the manufacturer's instructions. Samples were run in duplicates. In both cases, the absorbances were read at 450 nm as the primary wave length in a plate spectrophotometer (Tecan Infinite F200). TNF α and SAA concentrations were calculated after performing statistical regression with the corresponding standards.

Microarray analysis of gene expression

Twenty-five ng total RNA per sample was extracted (as described for real time RT-PCR) to obtain mRNA from distal colon sections of all mice, and was used for Whole Transcriptome Amplification (Sigma) according to manufacturer's recommendations. Samples of 10 μg cDNA obtained after retrotranscription of colonic mRNA were fragmented, biotinylated and hybridized to Mouse Gene ST 1.0 microarrays (Affymetrix) in which a total of 25,000 genes of the Unigene database were studied. This array shows the amount of genes that are altered with either treatment or due to colitis.

The analysis was performed in the facilities of the Parc Científic de Barcelona (Barcelona, Spain). Significance analysis of microarrays and gene ontology functional classification were carried out by an expert (Department of Biostatistics and Bioinformatics, IRB, Barcelona, Spain).

Statistical analysis

All the data obtained were plotted and statistically analyzed using standard software (GraphPad Prism 4.0 for Windows). Comparison of mean values between different groups of animals was made using the Student t-Test (comparisons between two groups) and ANOVA and Bonferroni's multiple-comparison post-test (for more than two groups). Comparison of HS and DAI scores was made according to Mann Whitney test (for two groups) or Kruskal-Wallis one-Way ANOVA followed by multiple-comparison Dunn's post-test (for more than two groups). Box plots depict 5th, 25th, 50th (median), 75th and 95th percentiles. Linear regression analysis was performed to establish the correlation among the clinical parameters studied. Data are expressed as mean \pm SEM or median \pm percentiles for non-parametric variables. P values < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

siTNF78 showed significant TNF α silencing *in vitro*

Figure 1 depicts the *in vitro* silencing efficiency of several 2'-O-methyl-siRNA TNF α with and without propanediol modifications (*siTNF78* and *siTNF-OMe*, respectively) in different cell types (HeLa, murine peritoneal macrophages and 4T1 murine breast carcinoma cells). Transfection in HeLa cells (**panel A**) shows that these siRNAs are fully capable to engage RISC and induce TNF α silencing when compared to a scrambled siRNA sequence (*siScr-OMe*). When peritoneal macrophages (**panel B**) were transfected with *siTNF78* again an effective endogenous TNF α silencing capacity was found when compared to the other siRNA molecules. This increased silencing capacity was also achieved in 4T1 cells (**panel C**).

Thus, among the siRNAs assayed, *siTNF78* showed the highest TNF α silencing efficiency (*i.e.*, *siTNF78* reduced mRNA TNF α levels by up to 94% in HeLa cells, 78% in peritoneal macrophages and 70% in 4T1 cells *versus* *siScr-OMe*).

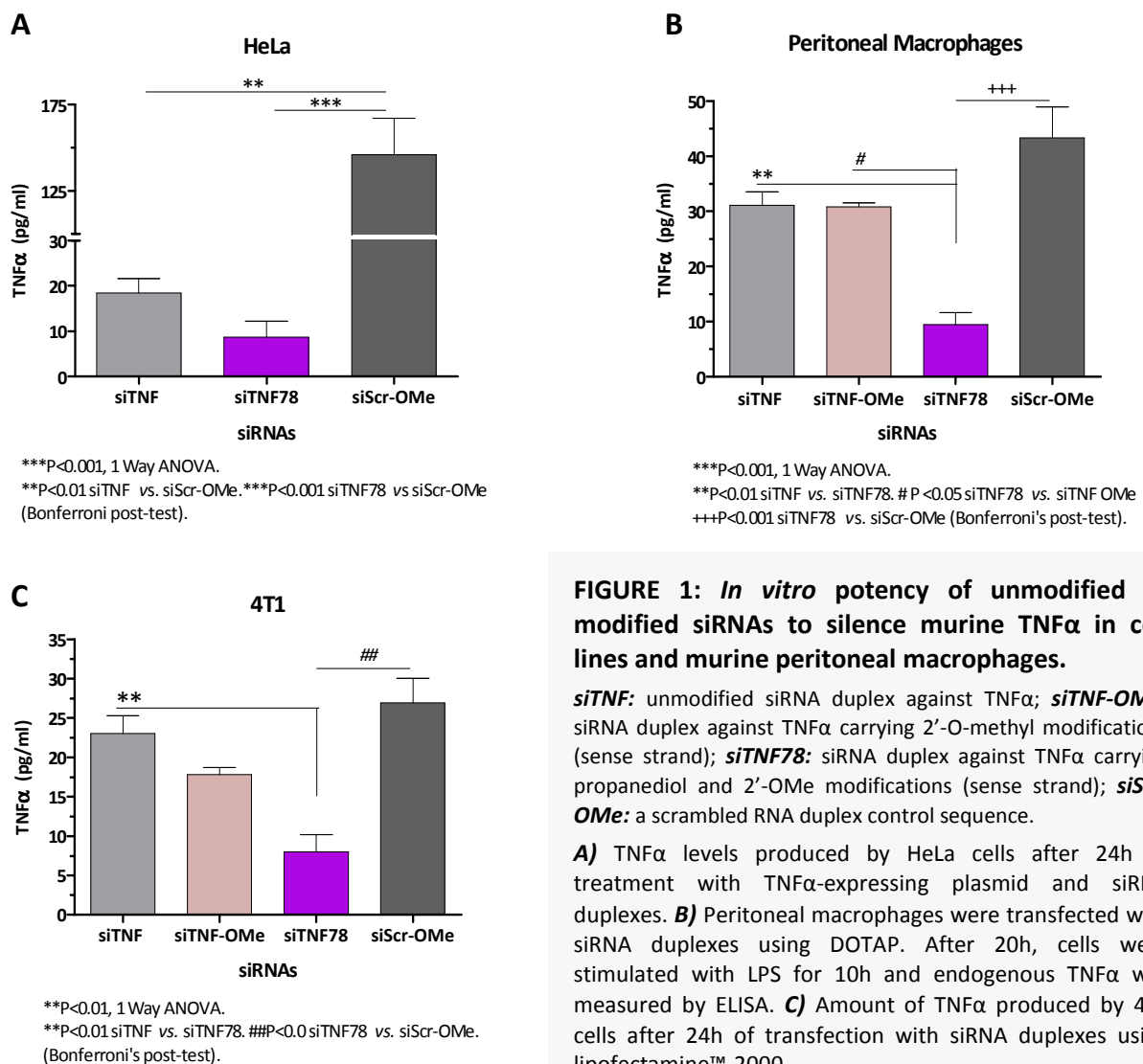


FIGURE 1: *In vitro* potency of unmodified or modified siRNAs to silence murine TNF α in cell lines and murine peritoneal macrophages.

siTNF: unmodified siRNA duplex against TNF α ; *siTNF-OMe*: siRNA duplex against TNF α carrying 2'-O-methyl modifications (sense strand); *siTNF78*: siRNA duplex against TNF α carrying propanediol and 2'-OMe modifications (sense strand); *siScr-OMe*: a scrambled RNA duplex control sequence.

A) TNF α levels produced by HeLa cells after 24h of treatment with TNF α -expressing plasmid and siRNA duplexes. **B)** Peritoneal macrophages were transfected with siRNA duplexes using DOTAP. After 20h, cells were stimulated with LPS for 10h and endogenous TNF α was measured by ELISA. **C)** Amount of TNF α produced by 4T1 cells after 24h of transfection with siRNA duplexes using lipofectamine™-2000.

Results are expressed as mean + SEM.

Intrarectally delivered siTNF78 ameliorated experimental DSS colitis at day 5

In view of the *in vitro* TNF α silencing capacity of the siRNA molecules, we next decided to test this ability *in vivo* in a murine model of DSS colitis in C57BL/6 female mice.

First, we performed a complete characterization of the disease model to assess the response to a 5 days long exposure to a 5% DSS solution (**figure 2**). As evidenced in these graphs, administration of 5% DSS induces a severe colitis. Disease activity index (DAI) values begin to increase early in time and peak on days 6-8 (**panel A**). Colon wet weight tended to increase and colon length to decrease as colitis progressed. Thus, the ratio colon weight/length increased significantly in colitic mice when compared to healthy controls at endpoint (day 8 post-administration of DSS) (**panel B**). MPO activity (**panel C**) was significantly higher in colitic mice *versus* healthy controls, indicating a high neutrophilic infiltration and an active inflammation at the endpoint. **Panel D** depicts colonic TNF α mRNA levels attained 8 days after the instauration of colitis. The expression of this proinflammatory cytokine is increased in colitic mice *versus* healthy controls (** $P < 0.01$). No animals had to be euthanized in accordance to our pre-established endpoint criteria and no mortality was registered.

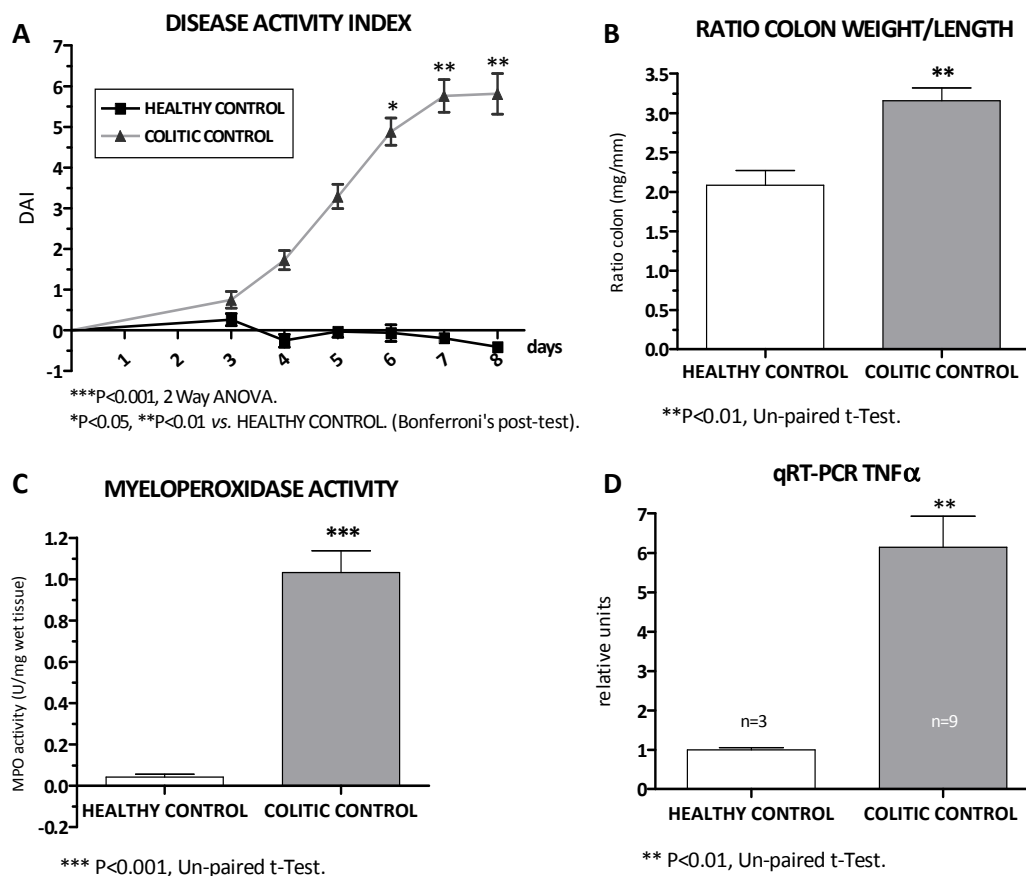


FIGURE 2: 5% DSS COLITIS IN FEMALE C57BL/6 MICE.

A) DISEASE ACTIVITY INDEX. Daily mean values. **B)** RATIO COLON WEIGHT/LENGTH (mg/mm) at endpoint (8 days). **C)** MPO ACTIVITY (U/mg wet tissue). Mean values per group at endpoint (8 days). **D)** TNF α mRNA LEVELS in colon at day 8 post-induction of 5% DSS colitis. TNF α mRNA levels were measured by qRT-PCR in distal colon segments of healthy and colitic controls. Results are expressed as mean \pm SEM.

Figure 3 depicts the time course and the clinical endpoint values of the variables selected to assess the putative therapeutic effects of the siRNA molecules in colitic mice. As evidenced in **panel 3A**, DAI values begin to increase early in time in all colitic mice. The siTNF78 colitic group maintained the lowest DAI values throughout the 5-day study, the difference being significantly different ($++ P < 0.01$) when compared to the siTNF colitic group at the endpoint (day 5).

Colon length decreased in colitic animals compared to healthy mice at endpoint (day 5 post-induction of DSS colitis). The siTNF78 colitic group exhibited the highest colonic length values among all colitic treated mice (significantly different from the siScr-OMe colitic group at endpoint, $+ P < 0.05$, *data not shown*). Values of the ratio colon weight/length of siTNF78 treated mice were closer to those of healthy controls and differed from those of siTNF and siScr-OMe treated groups ($+ P < 0.05$) (**panel 3C**). MPO activity (**panel 3D**) was significantly higher only in siTNF-OMe and siScr-OMe-treated colitic mice when compared to healthy controls ($*** P < 0.001$) at the endpoint (day 5). MPO activity was lower in siTNF78 treated mice than in siTNF-OMe treated animals ($+ P < 0.05$).

Figure 3E shows the percent survival of all experimental groups over the 5-day period. Six out of 14 mice (43%) died between days 3 and 5 in the siTNF colitic group; 3 out of 16 mice (18.8%) died at day 3 in the siTNF-OMe colitic group, and 8 out of 25 animals (32%) died amongst days 3 and 5 in the siScr-OMe colitic group. Only 4 out of 25 mice (16%) died between days 3 and 5 in siTNF78 colitic mice, demonstrating the effectiveness of this treatment in promoting the highest survival rate.

To ascertain whether the protective effect after siTNF78 intrarectal administration is confined exclusively to the colon, serum amyloid A levels were determined. SAA levels 5 days post-induction of colitis were up-regulated over 200-folds both in the siTNF78 and siScr-OMe colitic groups compared with healthy controls (*data not shown*). Thus, there was no evidence of systemic effects upon siRNA TNF α administration.

Microscopical grading of colitis was performed by an investigator blinded to the study design on H&E full-thickness colon sections at day 5. **Figure 3F** reveals that all colitic groups except siTNF78 colitic mice showed a significantly increased histological score median values compared to healthy controls. Yet again siTNF78 colitic animals differed statistically from siScr-OMe colitic mice ($+++ P < 0.001$). Median colonic microscopical damage score values [*and Tukey's hinges*] at day 5 were 1.5 [1.25 and 2.00] for healthy controls, 15.50 [11.50 and 17.25] for siTNF colitic mice, 9.50 [8.50 and 13.00] for siTNF-OMe, 8.62 [6.25 and 9.00] for siTNF78 and 16.50 [15.00 and 18.00] for siScr-OMe colitic groups. These results demonstrate a beneficial effect for siTNF78 colitic mice whose values did not differ statistically from those of healthy controls.

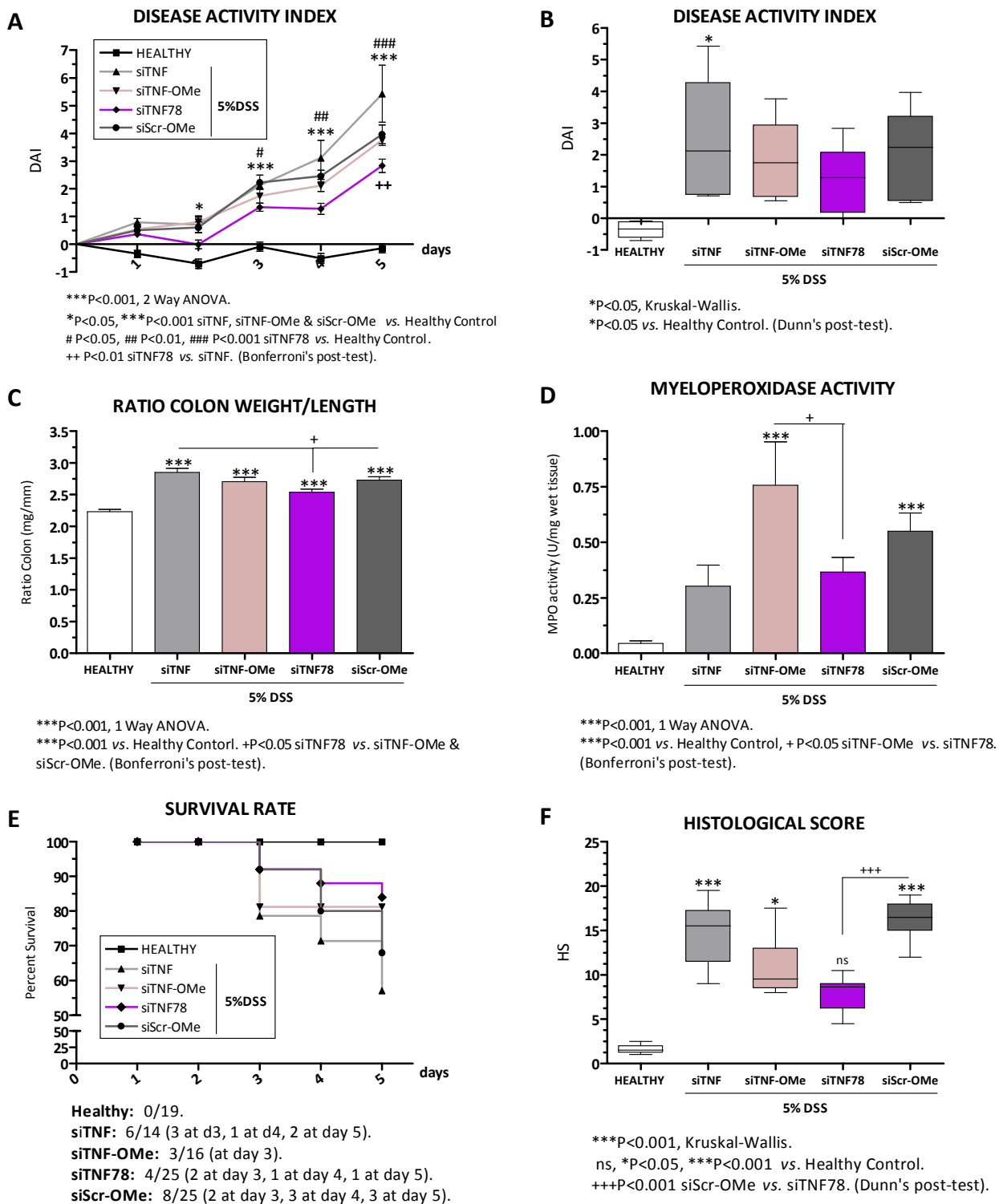


FIGURE 3: THERAPEUTIC RESPONSE AT DAY 5. 5% DSS was administered to C57BL/6 mice in their drinking water (*ad libitum*). At 48h and 96h animals were treated with siTNF, siTNF-OMe, siTNF78 or siScr-OMe. Animals were subjected to a daily observation during the experimental period to monitor signs of disease. Mice were euthanized at day 5 after the initiation of the experiment.

Healthy control mice untreated (**HEALTHY**); colitic mice treated with siRNA TNF α unmodified (**siTNF**); colitic mice treated with siRNA carrying 2-O'Me modifications (**siTNF-OMe**); colitic mice treated with siRNA duplex carrying 2-O'Me and propanediol modifications (**siTNF78**); colitic mice treated with a scrambled 2-O'Me-modified RNA duplex control sequence (**siScr-OMe**).

A) DISEASE ACTIVITY INDEX. Daily mean values per group. **B) DISEASE ACTIVITY INDEX.** Mean values per group in the 5-day period. **C) RATIO COLON WEIGHT/LENGTH.** Mean values (mg/mm) at endpoint (5 days) per group. **D) MPO ACTIVITY (U/mg wet tissue at endpoint).** **E) SURVIVAL RATE (%).** Daily mean values per group. **F) HISTOLOGICAL SCORE.** Four 200x magnification fields of each colon sample were scored blinded to treatment groups. *Note that the colitic siTNF78 group does not differ statistically from healthy controls.* Results are expressed as mean + SEM.

Figure 4A shows the aspect of caeca of healthy and colitic mice treated either with siTNF78 or siScr-OMe euthanized on day 5. Caeca of siScr-OMe colitic mice were smaller, with stiff consistency and bloody contents when compared to siTNF78 colitic animals. The obvious differences among these groups support the beneficial effect exerted by siTNF78 treatment in the large intestine.



FIGURE 4A: Macroscopic aspect of caeca of healthy controls and colitic mice treated either with siTNF78 or siScr-OMe, and euthanized 5 days post-induction of colitis.

These pictures show the scarce presence of haemorrhagic contents in caeca of siTNF78 when compared to siScr-OMe mice, restating the beneficial effects of this treatment even at more proximal levels.

As seen in **figure 4B** colitic mice euthanized at day 5 show severe and extensive damage in the colon. Inflammation was transmural, patchy and erosive, with a chronic mononuclear infiltration of macrophages, lymphocytes and plasma cells, but also accumulating neutrophils indicating both active acute disease and a tendency towards chronification; crypt damage, abscesses and loss of the normal mucosal architecture were also evidenced. In contrast, microscopical damage found in siTNF78 colitic mice was milder than that found in all other colitic groups in all these parameters (lower edema, submucosal infiltration and crypt and epithelial loss) resembling healthy control's appearance.

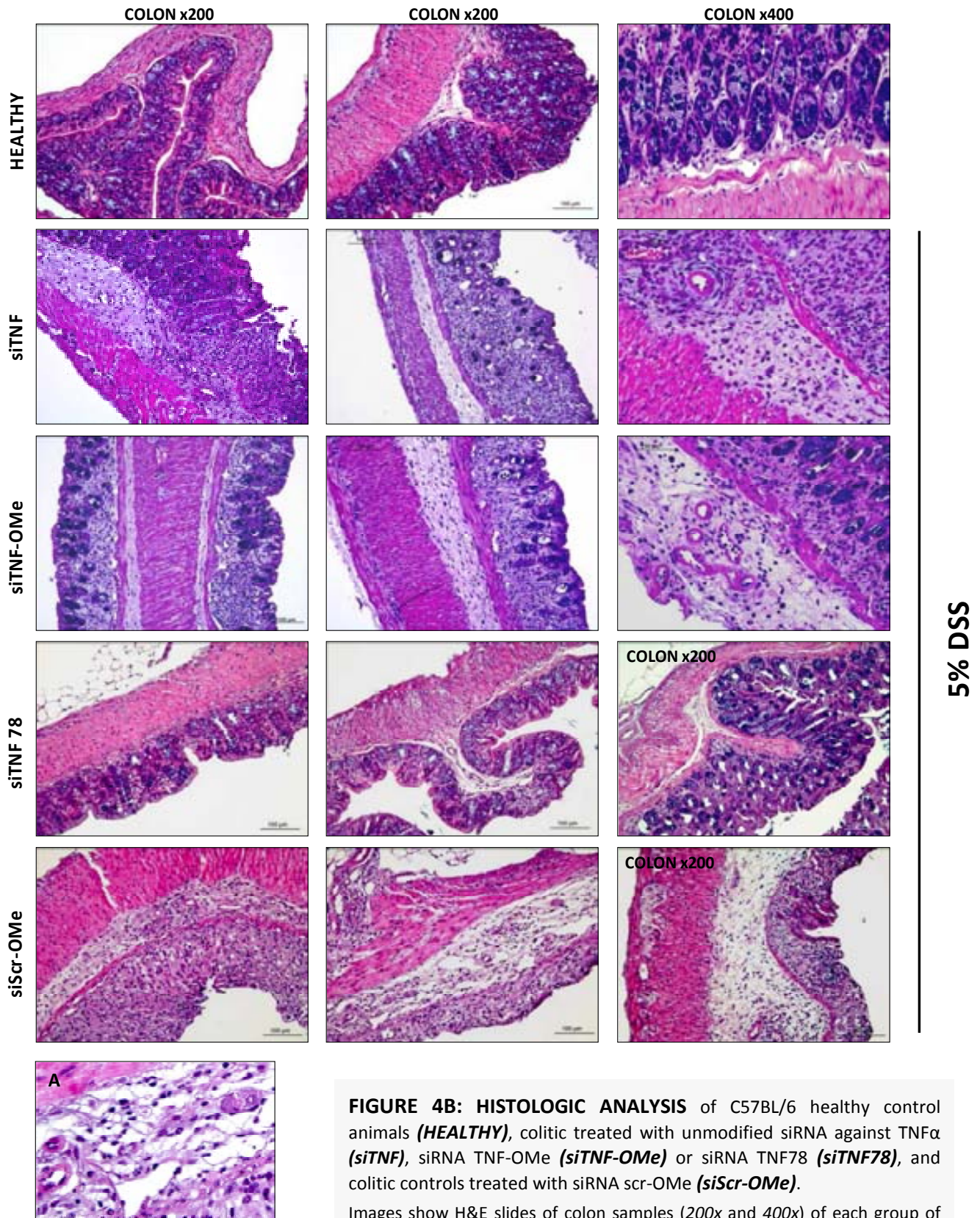


FIGURE 4B: HISTOLOGIC ANALYSIS of C57BL/6 healthy control animals (**HEALTHY**), colitic treated with unmodified siRNA against TNF α (**siTNF**), siRNA TNF-OMe (**siTNF-OMe**) or siRNA TNF78 (**siTNF78**), and colitic controls treated with siRNA scr-OMe (**siScr-OMe**).

Images show H&E slides of colon samples (200x and 400x) of each group of animals at endpoint (day 5).

A) Magnification of the inflammatory infiltrate of siScr-OMe colitic mice.

Intrarectally delivered siTNF78 ameliorated experimental DSS colitis at day 8

Figure 5 summarizes the findings corresponding to animals undergoing the same experimental procedures but euthanized on day 8. Body weight loss was again evidenced since days 3-4 and remained at low levels until the endpoint (day 8, *data not shown*).

DAI values rose early in all colitic groups (**panel A**). Again, siTNF78 colitic mice showed a significant reduction in DAI values at day 8 when compared to siTNF and siScr-OMe ($++ P<0.01$) as well as siTNF-OMe colitic animals ($### P<0.001$); throughout the 8-day experimental period siTNF78 colitic mice showed lower DAI values when compared to all other colitic groups. Median DAI values at endpoint did not achieve statistical significance among siTNF78 and siScr-OMe colitic groups when compared to healthy controls (**panel B**).

Once more, siTNF78 colitic group had colon length values significantly higher than those of siScr-OMe colitic mice ($+++ P<0.001$, *data not shown*). The ratio colon weight/length increased significantly in colitic mice when compared to healthy controls. Again, siTNF78 mice had a significantly lower colonic ratio when compared to siScr-OMe colitic mice ($+++ P<0.001$) (**panel C**).

For a second time, MPO activity (**panel 5D**) was significantly increased only in siTNF-OMe and siScr-OMe colitic animals when compared to MPO activity values of healthy controls at the endpoint (day 8); siTNF78 colitic mice reached statistically significant lower MPO activity values *versus* those of siScr-OMe colitic animals ($+ P<0.05$).

Figure 5E reflects the percent survival of all experimental groups throughout the 8-days study. Six out of 8 mice (75%) died between days 3 and 7 in the siTNF group; 3 out of 8 mice (37.5%) died among days 4 and 6 in the siTNF-OMe group, and 5 out of 12 animals (41.6%) died amongst days 4 and 5 in the siScr-OMe group. Once more, the siTNF78 group had the lowest mortality rate with 4 out of 12 dead mice (33.3%) between days 5 and 6.

Histological score median values were significantly reduced in the siTNF78 group at day 8 (*ns, versus healthy controls and + P<0.05 versus siScr-OMe*) (**Panel F**). Median values [*and Tukey's hinges*] were 1.00 [0.75 and 1.25] for healthy controls, 16.25 for siTNF, 14.50 for siTNF-OMe, 8.75 [7.75 and 9.5] for siTNF78 and 15.50 [14.50 and 21.75] for siScr-OMe colitic groups of mice. These results demonstrate a clear beneficial effect after siTNF78 local administration.

Figure 6 exhibits colonic micrographs of all experimental groups of mice at the endpoint (day 8). Colonic damage was still extensive in all colitic groups. However, the extent of mucosal and submucosal inflammation, edema and inflammatory infiltration found in siTNF-OMe and particularly in siTNF78 treated colitic animals was lower. In these groups there was only slight crypt distortion and epithelial loss and no abscesses or erosions.

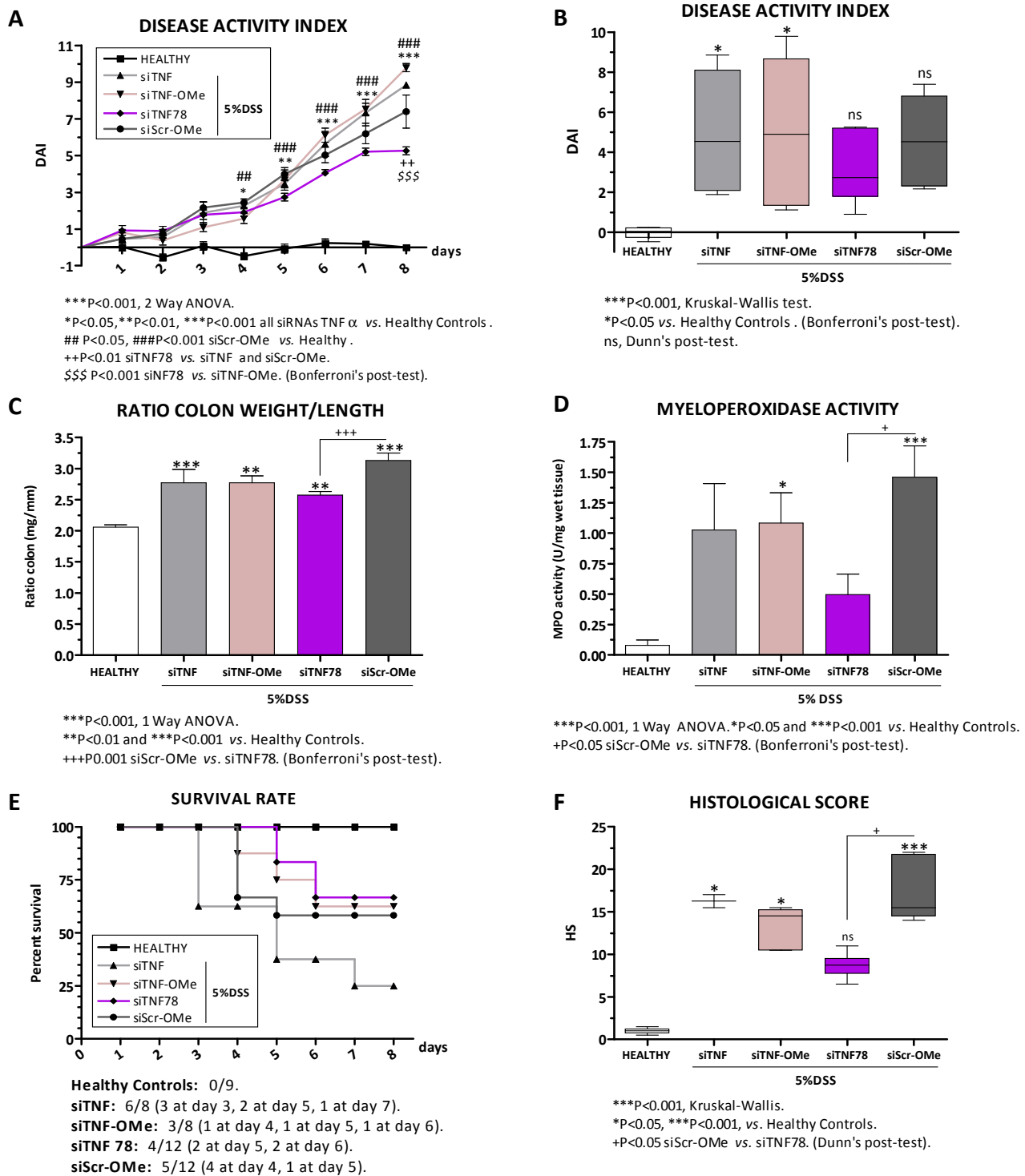
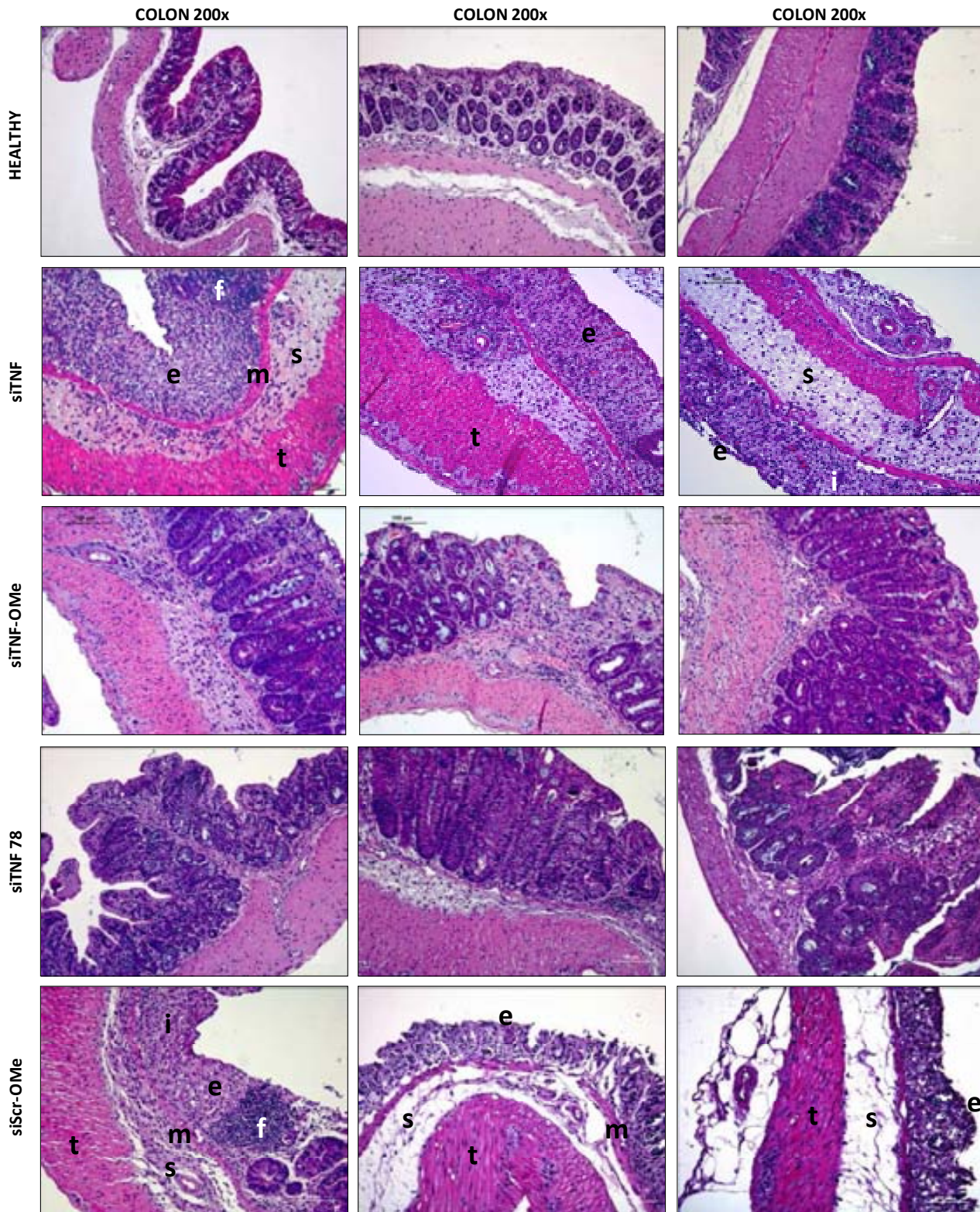


FIGURE 5: THERAPEUTIC RESPONSE AT DAY 8. 5% DSS was administered to C57BL/6 mice in their drinking water (*ad libitum*). At 48h and 96h animals were treated with siTNF, siTNF-OME, siTNF78 or siScr-OME. Animals were subjected to a daily observation during the experimental period to monitor signs of disease. Mice were euthanized at day 8 after the initiation of the experiment.

Healthy control mice untreated (**HEALTHY**); colitic mice treated with siRNA TNF α unmodified (**siTNF**); colitic mice treated with siRNA carrying 2-O'Me modifications (**siTNF-OME**); colitic mice treated with siRNA duplex carrying 2-O'Me and propanediol modifications (**siTNF78**); colitic mice treated with a scrambled 2-O'Me-modified RNA duplex control sequence (**siScr-OME**).

A) DISEASE ACTIVITY INDEX. Daily mean values per group. **B)** DISEASE ACTIVITY INDEX. Mean values per group in the 8-day period. **C)** RATIO COLON WEIGHT/LENGTH. Mean values (mg/mm) at endpoint (8 days) per group. **D)** MPO ACTIVITY (U/mg wet tissue at endpoint). **E)** SURVIVAL RATE (%). Daily mean values in each group. **F)** HISTOLOGICAL SCORE. Four 200x magnification fields of each colon sample were scored blinded to treatment groups. Note that siTNF78 colitic group does not differ statistically from healthy controls. Results are expressed as mean + SEM.



5% DSS

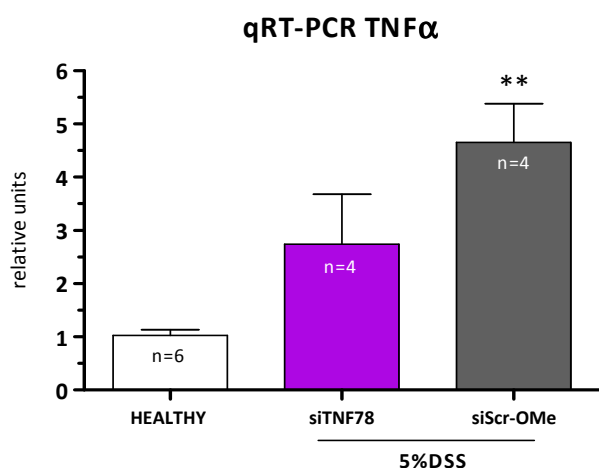
FIGURE 6: HISTOLOGIC ANALYSIS of C57BL/6 control mice (**HEALTHY**), colitic treated with unmodified siRNA against TNF α (**siTNF**), siRNA TNF-Ome (**siTNF-OMe**), siRNA TNF78 (**siTNF78**) and colitic controls treated with siRNA scr-Ome (**siScr-OMe**).

Images show H&E slides of colon samples (200x) of each experimental group at endpoint (8 days).

Structures: **e**, epithelial disruption; **f**, lymphoid follicle; **i**, inflammatory infiltration; **m**, lamina muscularis mucosae; **s**, submucosal edema; **t**, muscularis thickening in lamina muscularis propria.

Intrarectally delivered siTNF78 exhibited TNF α mRNA silencing in colon

At day 3 mean TNF α mRNA levels were increased 4.7-fold in colon homogenates of siScr-OMe colitic mice compared to healthy controls (** $P < 0.01$) (figure 7 and table 3). A single intrarectal administration of siTNF78 (56 hours after starting the DSS regime and 16 hours before euthanasia) was able to reduce colonic levels of TNF α mRNA compared to siScr-OMe colitic controls, reaching values not statistically different from those of healthy controls. Table 3 shows quantitative TNF α mRNA levels in colonic homogenates of colitic mice 3, 5 and 8 days after instauration of colitis.



** $P < 0.001$, 1 Way ANOVA.

** $P < 0.01$ vs. Healthy Controls. (Bonferroni's post-test).

FIGURE 7: siRNA TNF α silencing efficiency in the DSS model of colitis. 5% DSS was administered to C57BL/6 mice in their drinking water.

qRT-PCR at day 3: At 56 h animals were intrarectally treated with siTNF78 or siScr-OMe, and colon was obtained for mRNA extraction 16h later. Subsequently, the amount of TNF α was measured by qRT-PCR.

Healthy control mice untreated (**HEALTHY**); colitic mice treated with siRNA TNF α duplex carrying 2-O'Me and propanediol modifications (**siTNF78**); colitic mice treated with a 2-O'Me-modified scrambled siRNA duplex control sequence (**siScr-OMe**).

Results are expressed as relative units (mean + SEM) (relative to healthy controls).

	TNF α mRNA (day 3)	SEM	TNF α mRNA (day 5)	SEM	TNF α mRNA (day 8)	SEM
Healthy Controls	1.03	0.11	1.825	0.47	1.14	0.25
DSS + siTNF	-	-	17.13	6.28	2.92	0.75
DSS + siTNF-OMe	-	-	36.22	4.75	7.23	1.77
DSS + siTNF78	2.74	0.93	28.82	4.70	8.51	1.70
DSS + siScr-OMe	4.66	0.73	17.22	5.75	6.67	0.81

TABLE 3: Mean (\pm SEM) TNF α mRNA values at days 3, 5 and 8 in distal colon of colitic mice

Intrarectally delivered siRNA TNF α did not reduce TNF α protein levels in serum

As shown in figure 8 systemic TNF α protein levels both at days 3 and 5 were significantly increased in all colitic mice when compared to healthy controls. As expected, the intrarectal administration of any of the siRNA TNF α molecules induced a reduction in systemic protein TNF α levels at either endpoint, once again confirming the local therapeutic effect of these siRNA molecules when delivered directly into the colonic mucosa.

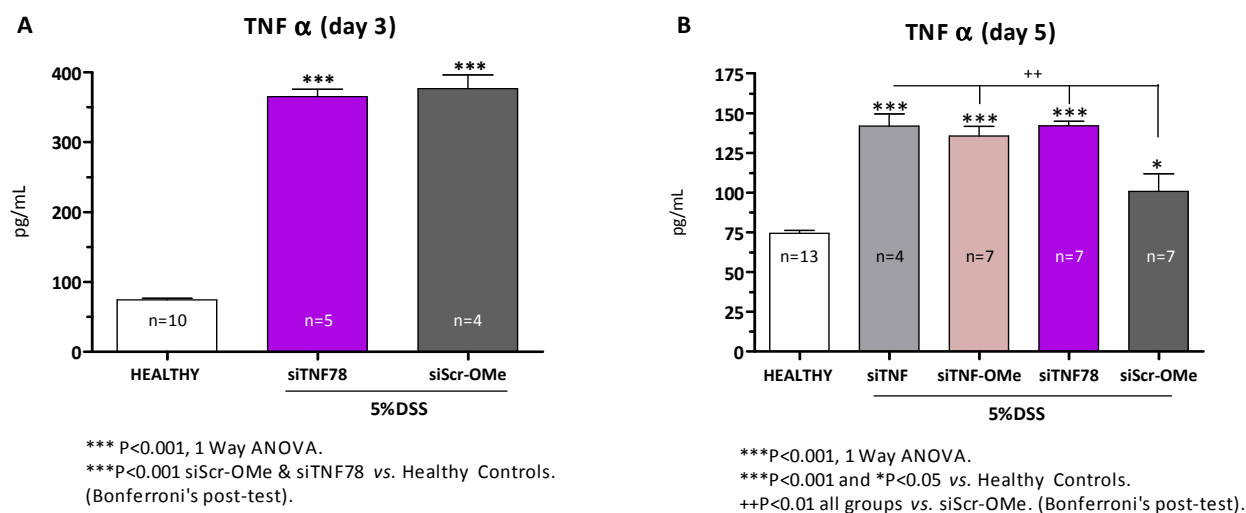


FIGURE 8: Serum TNF α levels (pg/mL) at day 3 (A) and at day 5 (B), analyzed by ELISA. Mice were administered intrarectally once (at day 2 after induction of colitis) or twice (at days 2 and 4) with siRNA TNF α sequences (either modified or not). Sera were obtained at days 3 and 5 post-induction of colitis and TNF α protein levels were measured by ELISA. Results are expressed as mean + SEM.

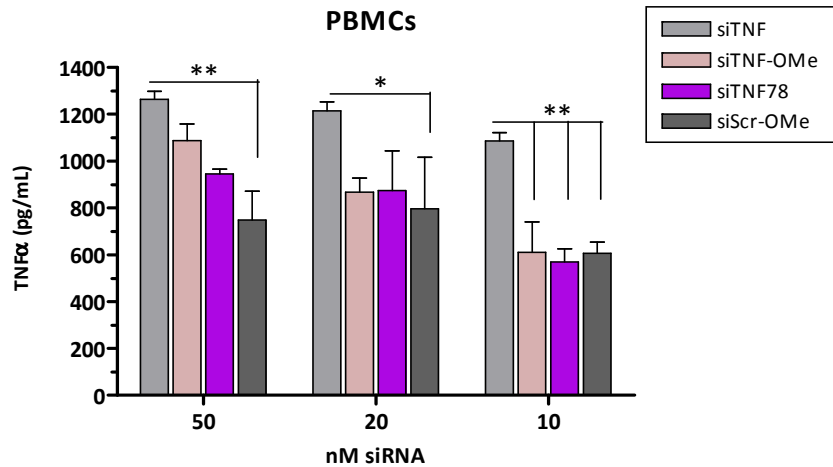
Healthy control mice untreated (**HEALTHY**); colitic mice treated with an unmodified siRNA TNF α duplex (**siTNF**); colitic mice treated with a siRNA TNF α duplex carrying 2-O'Methyl modifications (**siTNF-OMe**); colitic mice treated with a siRNA TNF α duplex carrying 2-O'Methyl and propanediol modifications (**siTNF78**); colitic mice treated with a 2-O'Me-modified scrambled RNA duplex control sequence (**siScr-OMe**).

Chemical modifications result in reduced innate immune system activation

It is known that some siRNA molecules (particularly when combined with lipids) can bind to both membrane-bound and intracellular Toll-like receptors (TLR) and mediate type I interferon responses (*i.e.*, IFN- α/β) resulting in an unspecific immunostimulation both *in vitro* and *in vivo* [55, 56]. For this reason, we decided to study the immunostimulatory capacity of the siRNA TNF α molecules (modified and unmodified) and complexed with DOTAP in PBMCs from healthy human donors. Murine TNF α siRNA sequences cannot inhibit the expression of huTNF α due to absence of complete sequence homology and/or absence of bioactivity in cells of human origin; however, in these cells murine TNF α siRNAs can elicit TLR activation resulting in huTNF α release.

Figure 9 shows that among the siRNA duplexes studied, siTNF was the only one inducing an increased endogenous huTNF α production in PBMCs at the three concentrations assayed (10, 20 and 50 nM). On the contrary, all chemically modified siRNAs exhibited a reduced ability (from 30 to 40%) to induce huTNF α release by PBMCs compared to unmodified siTNF at all concentrations tested. Mean values (\pm SEM) were 1188 ± 53.07 for siTNF, 854.6 ± 138.0 for siTNF-OMe, 796.2 ± 115.2 for siTNF78 and 717.2 ± 57.14 for siScr-OMe.

These data demonstrate that the chemically modified siRNAs used in these experiments are able to circumvent immune TLR-mediated stimulation in human PBMCs.



Source of variation: *** $P < 0.001$ (group), * $P < 0.05$ (dose), 2 Way ANOVA.
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. siTNF (Bonferroni's post-test).

FIGURE 9: Chemically modified siRNA molecules did not induce immunostimulatory effects in PBMCs. Adherent PBMCs were transfected with various concentrations (10, 20, 50 nM) of different siRNAs. Subsequently, huTNF α was measured in the supernatants by ELISA to assess the immunostimulatory capacity of the siRNA molecules. Data are expressed as mean + SEM.

siTNF: unmodified siRNA TNF α duplex; *siTNF-OMe*: siRNA TNF α duplex carrying 2-O'methyl modifications; *siTNF78*: siRNA TNF α duplex carrying 2-O'methyl and propanediol modifications; *siScr-OMe*: a scrambled 2-O'methyl-modified siRNA duplex control sequence.

Figure 10 shows IFN- α (Panel A) and IFN- β (Panel B) mRNA levels at day 5 in colon as the specific response generated after activation of either TLR7/TLR8 (IFN- α) or TLR3 (IFN- β) exerted by the siRNA molecules. Both figures demonstrate that any of the siRNAs elicited direct activation of these TLRs. IFN- α and IFN- β mRNA levels were similar in all groups, suggesting the absence of unwanted innate immune stimulation (*i.e.*, off-target effects).

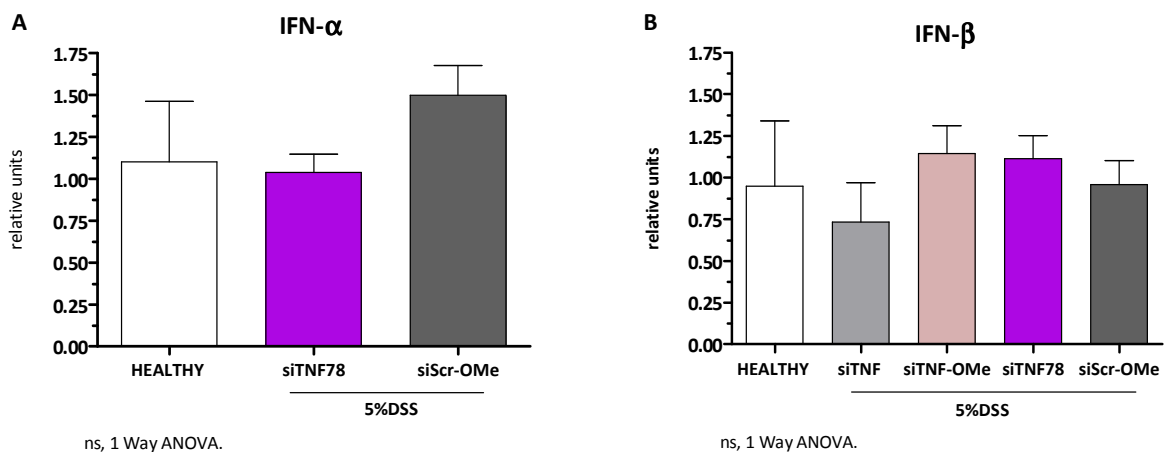


FIGURE 10: Chemically modified siRNAs did not induce IFN- α (A) or IFN- β (B) expression in colon extracts of colitic treated mice at day 5. Mice were administered intrarectally at days 2 and 4 after induction of colitis with siRNA TNF α sequences (either modified or not) complexed with cationic lipids. Colon extracts were obtained at day 5 post-induction of colitis and mRNA levels were measured by qRT-PCR. Results are expressed as mean + SEM (relative to healthy controls). No significant differences were obtained with any siRNA molecule in terms of IFN- α/β mRNA levels in colon homogenates.

Untreated healthy mice (**HEALTHY**); colitic mice treated with an unmodified siRNA TNF α duplex (*siTNF*); colitic mice treated with a siRNA duplex with 2-O'Me modifications (*siTNF-OMe*); colitic mice treated with a siRNA duplex carrying 2-O'Me and propanediol modifications (*siTNF78*); colitic mice treated with a 2-O'Me-modified scrambled siRNA control sequence (*siScr-OMe*).

Correlation analysis

Linear regression analysis was performed to study the correlation between different clinical parameters using individual data of mice of all experimental groups. **Figure 11** shows positive correlations between MPO activity and the HS ($p < 0.0001$, $r^2 = 0.4044$), as well as between the colon weight/length ratio and the HS ($p < 0.0001$, $r^2 = 0.6773$) at day 5 (**panel A**); these correlations were also achieved at day 8 ($p = 0.0002$, $r^2 = 0.4103$; $p < 0.0001$, $r^2 = 0.7229$, respectively) (**panel B**).

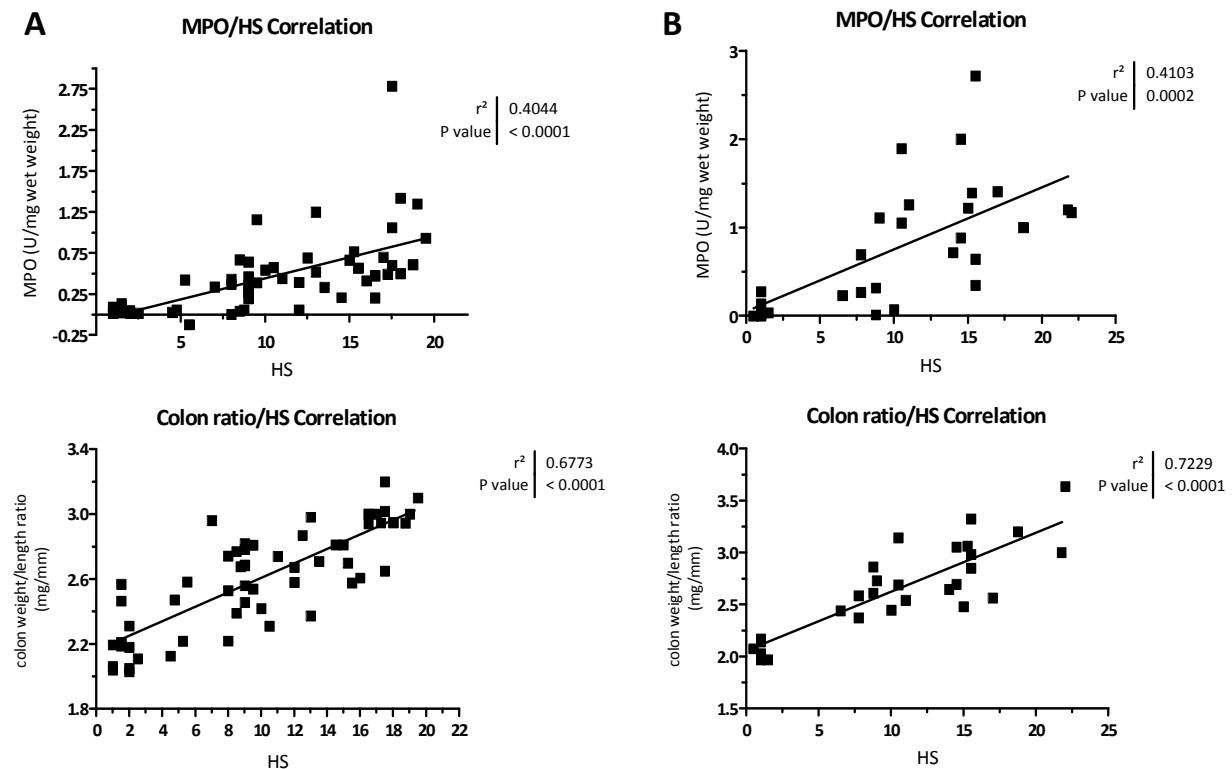


FIGURE 11: CORRELATION ANALYSIS. Linear regression analysis was performed to study the correlation between different clinical parameters using individual data of C57BL/6 mice of all experimental groups.

A) Correlations at day 5. **B)** Correlations at day 8.

GROUP		DAI	COLON LENGTH (cm)	SPLEEN WEIGHT (mg)	RATIO COLON (mg/mm)	MPO (U/mg wet tissue)	HS	SAA (µg/mL)
EU d5	Healthy controls	-0.35 ± 0.11	7.48 ± 0.10	57.58 ± 2.06	2.23 ± 0.04	0.045 ± 0.01	1.62 ± 0.13	9.04 ± 0.83
	DSS + siTNF	2.43 ± 0.87	5.83 ± 0.20	88.24 ± 10.53	2.85 ± 0.07	0.302 ± 0.10	14.63 ± 1.29	-
	DSS + siTNF-OMe	1.79 ± 0.57	6.01 ± 0.07	100.70 ± 5.48	2.71 ± 0.07	0.756 ± 0.20	11.14 ± 1.30	-
	DSS + siTNF78	1.16 ± 0.49	6.13 ± 0.09	87.50 ± 5.02	2.54 ± 0.05	0.366 ± 0.06	7.89 ± 0.47	2060 ± 1321
	DSS + siScr-OMe	1.95 ± 0.64	5.74 ± 0.09	101.60 ± 6.02	2.73 ± 0.05	0.550 ± 0.08	16.12 ± 0.54	2205 ± 1564
EU d8	Healthy controls	-0.08 ± 0.11	6.67 ± 0.10	52.83 ± 3.73	2.06 ± 0.03	0.07 ± 0.04	1.00 ± 0.13	-
	DSS + siTNF	4.29 ± 1.15	6.11 ± 0.20	41.00 ± 11.00	2.77 ± 0.21	1.03 ± 0.38	16.25 ± 0.75	-
	DSS + siTNF-OMe	4.31 ± 1.36	5.66 ± 0.09	38.00 ± 7.52	2.77 ± 0.11	1.08 ± 0.25	13.20 ± 1.11	-
	DSS + siTNF78	3.12 ± 0.66	6.20 ± 0.13	52.50 ± 2.50	2.57 ± 0.05	0.49 ± 0.16	8.68 ± 0.50	-
	DSS + siScr-OMe	3.99 ± 0.89	5.10 ± 0.15	65.63 ± 13.30	3.13 ± 0.11	1.46 ± 0.26	17.40 ± 1.30	-

TABLE 4:

Results of day 5 and day 8 follow-up studies. Data are expressed as mean ± SEM.

Gene array analysis in colitic mice treated with different siRNAs against TNF α

To gain insight into the molecular mechanisms underlying the therapeutic benefit provided by siTNF78 in this preclinical model, we analysed the differential gene expressions in colitic mice treated with various modified or unmodified TNF α specific siRNAs and siScr-OMe, and compared them to healthy animals, using a Mouse Gene ST 1.0 microarray (Affymetrix) consisting of 25,000 genes. Messenger RNA from distal colon extracts of healthy controls and colitic mice treated twice with the different siRNA duplexes and euthanized at day 5 post-induction of colitis was employed for this analysis.

The study indentified circa 3800 genes that were modulated significantly by the 5% DSS treatment. These were tagged as '*pathology-related*' genes. To simplify the analysis several genes were excluded: **1)** those which appeared equally regulated in all experimental groups, and **2)** those which appeared equally regulated in siTNF, siTNF-OMe, siTNF78 and siScr-OMe but were different in healthy controls. This left 2965 '*siRNA-specific*' altered genes, differentially expressed in each treatment group, which were further analyzed.

A heatmap was built using all *pathology-related* genes that allowed for a statistical similarity test per group (**fig. 12A**). This study showed that on their gene modulation pattern, siTNF and siScr-OMe treatments were similar, whereas siTNF78 and siTNF-OMe revealed similar genetic profiles and were more closely related to healthy controls on the basis of their gene expression pattern. This pattern similarity correlated well with the therapeutic effects measured through clinical parameters (figs. 3 and 5).

Differentially expressed genes in a given subgroup of treatments were analysed according to the Venn diagram shown in **figure 12B**. This was used to plot the genes that were altered only in siTNF-OMe, siTNF78 and siScr-OMe colitic groups. Most of the genes that were significantly altered (500) exhibited similar regulation in siTNF-OMe and siTNF78 and were differently regulated in siScr-OMe. Only 60 genes were exclusively affected by siTNF78 treatment. A heatmap of these genes showed strong pattern similarity with healthy controls for most genes (**fig. 12C**). Any of them was specifically implicated in inflammatory processes but were related to tissue repair mechanisms, such as the *cldn7* gene (Claudin 7, involved in tight-junction formation) and *ssh2* (Protein phosphatase slingshot homolog 2, implicated in actin regulation and cytoskeleton construction). Both were found to be up-regulated in siTNF78 as compared to healthy controls, whereas other genes present in a healthy colon epithelium (*muc1*, *muc2* -mucins 1 and 2- and *aqp4* -aquaporin 4-) were found to closely match the levels found in healthy controls. Of note, the *il10* gene was up-regulated after treatment with siTNF78, whereas the *ifng* (IFN- γ) was down-regulated in this group when compared to siScr-OMe and healthy controls.

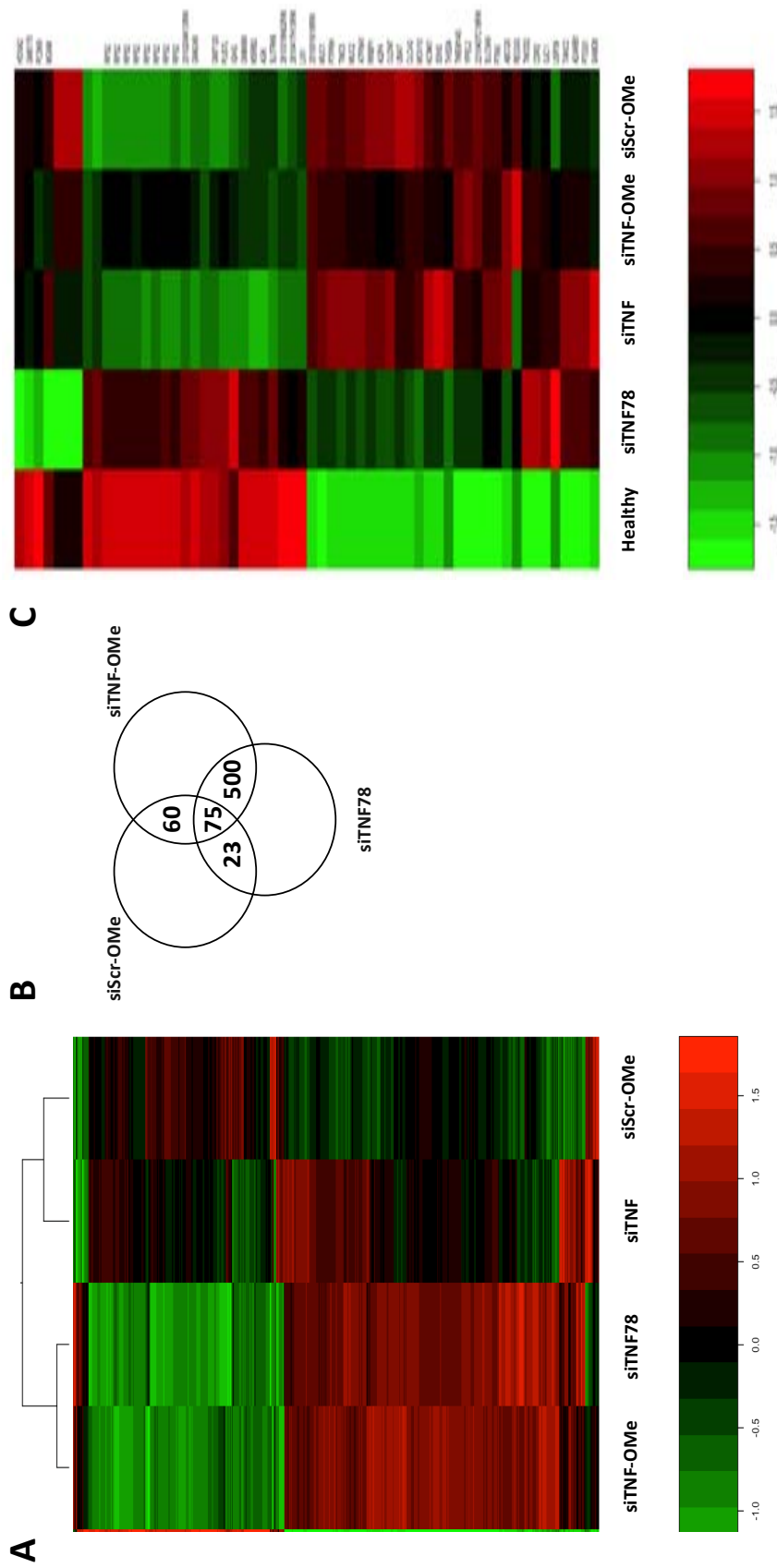


FIGURE 12: Differential gene expression in colitic mice after specific siRNA treatments.

A) General HEATMAP of differentially expressed genes after treatment with various siRNAs. Treatments are grouped by similarities based on their effects on gene expression. Genes are represented by horizontal strips; columns show the different treatments. The absolute-fold changes of gene-ratio are colour-coded as shown in the bar below (red and green represent positive and negative regulation, respectively).

B) Venn diagram of significantly up-regulated or down-regulated genes upon treatment.

Each circle represents a different siRNA treatment. Intersections indicate the number of differentially expressed genes in response to specific treatments. $siTNF-OMe \neq siTNF78 \neq siScr-OMe \rightarrow 0$ genes. Without $siTNF = siTNF-OMe = siTNF78 = siScr-OMe = Healthy$, and $siTNF = siTNF-OMe = siTNF78 = siScr-OMe \neq Healthy$ genes.

C) Clustering analysis of genes significantly altered by treatment with siTNF78. A total of 60 genes were found to be up-regulated in this experimental group, exclusively.

This study was conducted at the *Instituto de Recerca Biomédica de Barcelona at the Parc Científic (Barcelona, Spain)*.

1. - Pathways differentially enriched by siTNF78

In order to gain insight into the molecular mechanism mediating the therapeutic effects evidenced for siTNF78, we performed a gene ontology enrichment analysis comparing siTNF78 and siScr-OMe (**table 5**).

Several pathology-related pathways (*e.g.*, apoptosis, cytokine production, innate immune response, leukocyte adhesion, lymph node development, *etc.*) were significantly enriched in siScr-OMe treatment but not in siTNF78. By contrast, several pathways related to tissue repair and regeneration (*e.g.*, cell junction, morphogenesis of epithelium, regulation of cell differentiation, tight junction, *etc.*) and to the normal physiology of the colon epithelium (*e.g.*, keratin filament, sodium ion transport, water channel activity, *etc.*) were significantly enriched in siTNF78 but not in siScr-OMe.

Remarkably, the positive regulatory pathway of TNF α production was not activated after siTNF78 treatment when we compared siTNF78 and siScr-OMe groups with healthy controls.

Gene Ontology pathways enriched	
siScr-OMe	siTNF78
Apoptosis	3',5'-cyclic-nucleotide phosphodiesterase activity
Basal lamina	Amino acid transmembrane transporter activity
Cell adhesion	Cell junction
Cell migration	Chemokine activity
Complement activation	Cytokine activity
Cytokine production	Intermediate filament
DNA repair	Keratin filament
Innate immune response	Ligand-dependent nuclear receptor activity
Leukocyte adhesion	Morphogenesis of an epithelium
Lymph node development	Negative regulation of angiogenesis
MAPKKK cascade	Regulation of cell differentiation
Positive regulation of interleukin-6 production	Sodium ion binding
Positive regulation of tumor necrosis factor production	Sodium ion transport
Regulation of apoptosis	Tight junction
Vascular endothelial growth factor	Water channel activity
Vasculogenesis	Amino acid transmembrane transporter activity

TABLE 5: Gene Ontology pathways enriched upon treatment with siScr-OMe or siTNF78. Only pathways that are enriched in siScr-OMe but not in siTNF78, or *vice versa*, are shown.

When compared to healthy controls, several pro-apoptotic genes were over-expressed in siScr-OMe and siTNF78 groups. Among them, the *tnfa*, *casp4* (caspase 4), *naif1* (nuclear apoptosis inducing factor), *ngfr* (nerve growth factor receptor), *bik* (BCL2-interacting killer), *bcl10* (B-cell leukemia/lymphoma 10), *bad* (BCL2-associated agonist of cell death), *dedd* (death effector domain-containing), *dapk3* (death-associated protein kinase 3), *nod1* (nucleotide-binding oligomerization domain containing 1) were up-regulated in siScr-

OMe and siTNF78. The *casp3* (caspase 3) gene was up-regulated in the siScr-OMe group, only. However, all those genes were repressed by siTNF78 treatment when compared with siScr-OMe, exclusively.

2. - Chemical modifications result in reduced innate immune response

Next, we specifically checked the changes in the expression of genes that have previously been described to be altered by administration of siRNAs to human PBMCs in culture [57], in order to ascertain to what extent the chemical modification of siRNAs may abrogate unspecific innate immune stimulation, and assessed the levels of interferon-related genes. In agreement with *Cekaite et al.*, unmodified siRNA (siTNF) caused an up-regulation of the *cd14*, *irf7* (Interferon regulatory factor 7) and *tnfaip6* (TNF α -induced protein 6) genes, indicating active induction of inflammation, whereas with chemically modified siTNF78 those genes were down-regulated.

Thus, siTNF78 did not alter any of the genes related to off-target effects described by *Cekaite et al.*, suggesting that the double chemical modification of the siTNF78 abolishes the induction and activation of the immune response when compared to the rest of siRNAs employed, under our experimental conditions.

We then examined TLR activation *in vivo* by comparing gene expression levels for several TLR-related genes. Unmodified siTNF up-regulated several TLR genes compared to healthy controls (**Fig. 13A**). In contrast, modified siRNAs (siScr-OMe, siTNF78 and siTNF-OMe) showed a marked reduction of TLR gene expression when compared to unmodified siTNF (**Fig. 13B**). This reduction was highest for siTNF78.

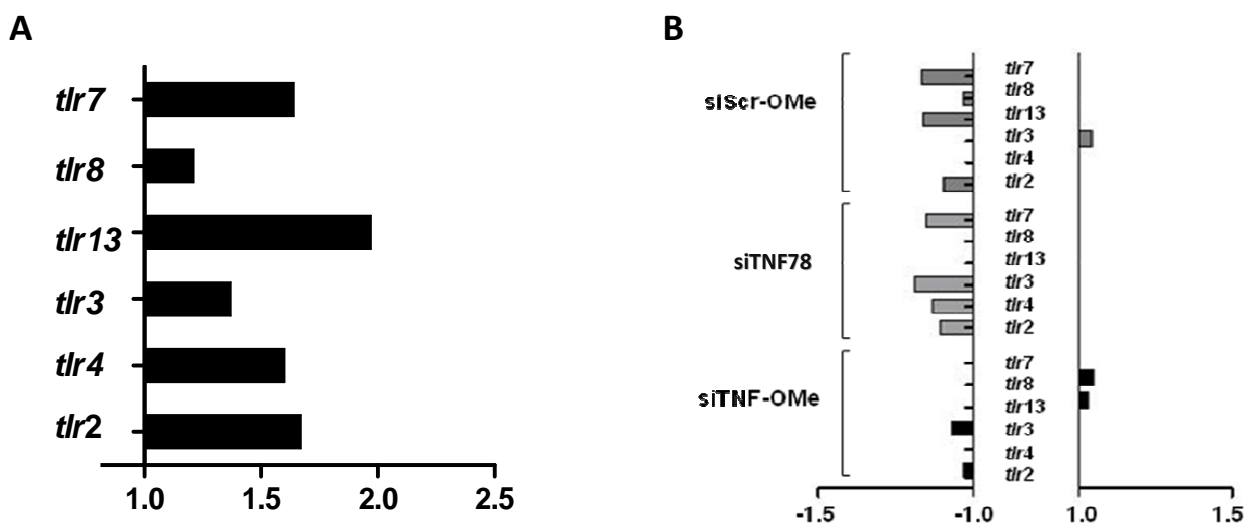


FIGURE 13: Modulation of the TLR-response mediated by siRNAs.

A) Induction of gene expression by siTNF as compared to healthy controls.

B) Changes in gene expression induced by treatment with chemically modified siTNF78 and siTNF-OMe, or with siScr-OMe, as compared to unmodified siTNF.

DISCUSSION

TNF α plays a major role in inflammatory responses and has therefore been identified as a major therapeutic target in chronic inflammatory diseases, including IBD and arthritis. Consequently, neutralization of TNF α by antibodies, soluble receptors or antisense oligonucleotides has shown significant success [5, 15, 27, 58]. RNAi is an innovative tool which might provide alternative ways to treat genetic or acquired diseases [59]. However, before siRNAs might be clinically tested, a number of shortcomings need to be addressed. To improve their stability and bioavailability and to decrease their effects on the innate immunity are thus crucial achievements [60-63].

Zhang et al. [64] reported efficient silencing of TNF α mRNA after rectal delivery of an unmodified siRNA in 5% DSS colitic mice. However, despite specific TNF α silencing no clinical improvement was observed. In the present study we used the same murine TNF α specific siRNA sequence described by Zhang et al [64], but added several chemical modifications to the molecule with the aim to confer nuclease stability, to improve absorption and to abolish the so-called off-target effects due to TLR stimulation [60-63]. Two 2'-O-methyl modifications were incorporated to the aforementioned nucleotide sequence to improve the stability and potency of the siRNA. Propanediol modification at the 3'-end of the siRNA sequence was also tested since, according to previous results [65], this modification improves chemical stability in the context of antisense delivery.

So, we decided to evaluate the *in vitro* and *in vivo* silencing ability of several native or chemically modified siRNA molecules directed towards the murine TNF α gene. As for the results obtained *in vitro*, siRNAs carrying propanediol and/or 2'-O-methyl modifications exhibited an increased TNF α silencing efficiency *in vitro* (figure 1). The differences observed might be due in part to an increased stability of siTNF78 when compared to the rest of siRNAs assayed. Hence, we evaluated other aspects which might influence siRNA-mediated silencing including off-target effects or stimulation of cellular protective mechanisms that may have been implicated (*Functionally enhanced siRNA targeting TNF α attenuates DSS-induced colitis and reduces TLR-mediated immunostimulation in mice*, Sandra M. Ocampo & Carolina Romero et al., submitted manuscript to *Molecular Therapy*).

Since murine TNF α - siRNA sequences cannot silence human TNF α expression, we assayed the effects of the different siRNA molecules on huTNF α release by human siRNA-transfected PBMCs. This was taken as an index of their ability to cause unspecific immune stimulation through TLRs. In all cases, siTNF78 provided the best TNF α silencing *in vitro* and the lowest huTNF α release by PBMCs.

As for the results obtained *in vivo* in the murine DSS colitis model, we consistently found that siTNF78 was the only siRNA able to reduce TNF α mRNA (figure 7) in mice receiving 4 nmoles intrarectally on day 2 after induction of colitis. As shown in figures 3 and 5, siTNF78 treatment produced significant improvements in quantitative and qualitative

clinical outcomes of disease in colitic treated mice, when compared to unmodified siTNF, siTNF-OMe and siScr-OMe treated colitic animals. However, in our study the reduction in TNF α mRNA levels were modest when compared to those of the study of Zhang et al. [64]. Colon length and the ratio colon weight/length, a value indicative of colonic edema and/or hyperplasia, were significantly improved both at days 5 and 8 in siTNF78 treated colitic mice compared to all other treated colitic groups. Histological scores of siTNF78 treated animals also showed reduced inflammation compared with siScr-OMe at both time points. Neutrophilic infiltration, assessed by MPO activity in colon extracts, was also significantly reduced after siTNF78 treatment in colitic mice at days 5 and 8. Most importantly, animal survival rate was clearly improved in mice treated with siTNF78, suggesting that the beneficial local effects resulted in a significant amelioration of the general physiological state of the animal.

Interestingly, unmodified siTNF worsened animal survival (*figures 3E and 5E*) and cecal inflammation under visual inspection (*figure 4A*) as compared to siScr-OMe. These observations are not in agreement with the results published by Zhang et al [64] using the same protocol with unmodified siRNA against TNF α . In that study, the authors showed an important reduction of murine TNF α mRNA in the distal colon of treated mice, without phenotypic amelioration. In our study, despite the fact that unmodified siTNF α caused a higher local silencing, it was unable to improve the clinical outcome. In several studies involving acute DSS colitis [66, 67], complete TNF α neutralization by monoclonal antibodies (mAb) [68], failed to block or even exacerbated disease parameters. This has prompted some authors [15] to suggest that in the acute form of DSS colitis disease protection may not be strictly related to the degree of the TNF α inhibition attained; a small amount of TNF α may actually be protective in the early stages of disease development. Antisense siRNA (or low dose mAb treatment) may not completely block TNF α production and, hence, might improve treatment efficacy in the acute model [15]. The pro-inflammatory action of TNF α is critical for disease initiation, whereas its anti-inflammatory activity helps resolving the disease. This dual role for TNF α has also been demonstrated in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis [69], suggesting that it may be beneficial to maintain certain levels of TNF α .

In addition, the importance of TLR activation in assessing the performance of siRNA drugs has only been recognized in the last couple of years [53]. TLR3 has been shown to mediate the protective effects of poly (I:C) in DSS-induced acute colitis [70]. In the present study, animals treated with chemically modified siRNA molecules (particularly siTNF78) did not exhibit apparent unspecific immune stimulation, as suggested by the low IFN- α and IFN- β mRNAs in colonic homogenates (*figure 10*). This is in a agreement with the lack of effect of such modified siRNAs on huTNF α release by human PBMCs (*figure 9*) which is considered a good model to test TLR7/8 activation by siRNAs [57]. Interestingly, stimulation of TLR3 by the administration of unmodified siTNF was not protective in our system, probably because of

the concomitant stimulation of several pro-inflammatory cytokines and TLRs by this siTNF. This treatment also stimulated the expression of TLR7/8, TLR2, TLR4 and TLR13, whereas the remaining siRNAs chemically modified with OMe or OMe-Propanediol were effective in partially suppressing these genes.

Given the lack of information regarding the mechanism of action by which siRNAs against TNF α might contribute to improving colitis, we decided to perform a whole-genome differential expression analysis with colitic mice treated with the siRNAs featured in our study. Our major interest was to gain insight into the genes involved in the therapeutic effects observed upon local siTNF78 (OMe-Propanediol) delivery. Only 60 genes were exclusively modulated by this treatment; most of them were unchanged as compared to healthy controls, and hence were found in normal colon epithelium. More interesting information was obtained by analysing the enrichment of gene ontology pathways in either siTNF78 or siScr-OMe group *versus* healthy controls. The genes which were found up-regulated in the siScr-OMe group have also been described in other studies of differential gene expression induced by DSS [18, 71], and include cytokine production, innate immune response, lymph node development and angiogenesis. None of those pathways were enriched by siTNF78 treatment. Instead, several pathways related to tissue repair, normal colon function and chemokine modulation were up-regulated in this group, suggesting that colonic inflammation is inhibited and tissue repair is activated.

Moreover, gene array data indicated that the double modification -2'OMe and propanediol- conferred diminished TLR stimulation ability compared with the single 2'OMe modification (*figure 13B*). It has been shown that incorporation of 2'OMe modifications can dramatically increase nuclease resistance in serum-rich environments [57, 61] as compared to unmodified dsRNA [72]. Additionally, and depending on the position, as few as two 2'OMe modifications can prevent immune stimulation mediated through TLR7 pathways [73]. The mechanism by which 2'OMe modification reduces immune stimulation is not well established. It has been suggested that human TLRs might be preferentially activated by pathogen-associated RNA which contains fewer modified nucleosides than does host RNA [74]. Addition of 2'OMe modifications to positions 1 and 2 of the sense strand, as in the present study, inhibited the incorporation of this strand into RISC, thereby reducing off-target effects [75]. The synergy between 2'OMe and propanediol modifications with respect to TLR inhibition has not been previously reported. Regardless of the mechanism of action for propanediol, our results *in vivo* were consistent with data obtained *in vitro*, clearly showing that siTNF78 was the only treatment resulting in a significant improvement of quantitative and qualitative clinical parameters of the murine DSS-induced colitis.

The use of liposomes as carrier vehicle allows the internalization of siRNA molecules by the intestinal mucosa, and abrogates its degradation [76]. However, it may enhance the immune stimulatory effects of siRNA molecules [77]. Previous studies have shown that injection of siRNAs complexed with cationic liposomes (*e.g.*, DOTAP) in mice induces a

potent systemic immune response, in the same range as the TLR9 ligand CpG, with IFN- α systemic production [77, 78], whereas injection of naked unmodified siRNAs or siRNAs conjugated to cholesterol do not cause significant immune stimulation [79]. In this respect, any of our modified siRNA molecules complexed with DOTAP stimulated the production of TNF α in human PBMCs when compared to the immunostimulatory siRNA molecule assayed by *Sioud et al.* [56]. Double-stranded siRNAs, even complexed with lipids, are very less effective in promoting unspecific immune stimulation than single-stranded sense or antisense sequences [56]. This may have also contributed to the absence of immune stimulation encountered with the double-stranded siRNA molecules tested in our study.

Finally, gene expression analysis has also revealed that siTNF78 has antiapoptotic effects. The available data show that TNF α blockade by anti-TNF antibodies generally results in pro-apoptotic effects on lamina propria T cells and resident macrophages, but antiapoptotic effects on epithelial cells [80-83]. In the present study siTNF78 has exhibited an antiapoptotic effect compared to colitic mice treated with siScr-OMe. This antiapoptotic effect may be secondary to the inhibition of the expression of proinflammatory cytokines that are upstream of the pro-apoptotic genes and has also been observed for other unrelated molecules providing beneficial effects in the murine DSS colitis model [84]. In any case, the available data suggest that the benefits obtained with TNF α silencing strategies depend upon the activation of mechanisms markedly different from those elicited by TNF α blockade with antibodies.

In conclusion, this study has demonstrated that siTNF78 treatment in murine DSS colitis results in the reduction of the disease activity index, the colon weight/length ratio, the extent of neutrophilic infiltration and the microscopic evidence of inflammation, findings which are in agreement with the silencing ability confirmed both *in vitro* and *in vivo*. This successful application of chemically modified siRNA against TNF α in DSS-induced colitis is further supported by differential gene expression changes. These results will help develop strategies in the field of siRNA therapies intended to fight colon inflammation.

ACKNOWLEDGEMENTS

siRNA *in vitro* testing and other *in vitro* assays of this study were performed by Dr. Sandra M. Ocampo, part of Dr. J.C. Perales group, at the Dpto. Ciencias Fisiológicas II, Fac. Medicina, Universitat de Barcelona (Barcelona, Spain). We also want to acknowledge Dr. Ramon Eritja (Institute for Research in Biomedicine, Parc Científic de Barcelona, Spain) for support and siTNF78 design and production.

REFERENCES

1. Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1995;102:448-55.
2. Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2002;20:495-549.
3. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003;3:521-33.
4. Plevy SE, Landers CJ, Prehn J, et al. A role for TNF-alpha and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. *J Immunol* 1997;159:6276-82.
5. van Deventer SJ. Tumour necrosis factor and Crohn's disease. *Gut* 1997;40:443-8.
6. Papadakis KA, Targan SR. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med* 2000;51:289-98.
7. Prehn JL, Landers CJ, Targan SR. A soluble factor produced by lamina propria mononuclear cells is required for TNF-alpha enhancement of IFN-gamma production by T cells. *J Immunol* 1999;163:4277-83.
8. Papadakis KA, Targan SR. Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors. *Gastroenterology* 2000;119:1148-57.
9. Komatsu M, Kobayashi D, Saito K, et al. Tumor necrosis factor-alpha in serum of patients with inflammatory bowel disease as measured by a highly sensitive immuno-PCR. *Clin Chem* 2001;47:1297-301.
10. Funakoshi K, Sugimura K, Anezaki K, Bannai H, Ishizuka K, Asakura H. Spectrum of cytokine gene expression in intestinal mucosal lesions of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Digestion* 1998;59:73-8.
11. Murch SH, Lamkin VA, Savage MO, Walker-Smith JA, Macdonald TT. Serum concentrations of tumour necrosis factor alpha in childhood chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 1991;32:913-7.
12. Murch SH, Braegger CP, Walker-Smith JA, Macdonald TT. Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 1993;34:1705-9.
13. Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, Beagley KW, Bucy RP, Elson CO. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology* 1994;107:1643-52.
14. Neurath MF, Fuss I, Pasparakis M, et al. Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. *Eur J Immunol* 1997;27:1743-50.
15. Myers KJ, Murthy S, Flanigan A, et al. Antisense oligonucleotide blockade of tumor necrosis factor-alpha in two murine models of colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304:411-24.
16. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Menon S, Caddle LB, Coffman RL. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity* 1994;1:553-62.
17. Videla S, Garcia-Lafuente A, Antolin M, et al. Antitumor necrosis factor therapy in rat chronic granulomatous colitis: critical dose-timing effects on outcome. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;287:854-9.
18. Jung HC, Eckmann L, Yang SK, et al. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* 1995;95:55-65.

19. Ruemmele FM, Beaulieu JF, Dionne S, et al. Lipopolysaccharide modulation of normal enterocyte turnover by toll-like receptors is mediated by endogenously produced tumour necrosis factor alpha. *Gut* 2002;51:842-8.
20. Gitter AH, Bendfeldt K, Schmitz H, Schulzke JD, Bentzel CJ, Fromm M. Epithelial barrier defects in HT-29/B6 colonic cell monolayers induced by tumor necrosis factor-alpha. *Ann N Y Acad Sci* 2000;915:193-203.
21. Marano CW, Lewis SA, Garulacan LA, Soler AP, Mullin JM. Tumor necrosis factor-alpha increases sodium and chloride conductance across the tight junction of CACO-2 BBE, a human intestinal epithelial cell line. *J Membr Biol* 1998;161:263-74.
22. Brown SJ, Mayer L. The immune response in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2007;102:2058-69.
23. Danese S, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2006;12:4807-12.
24. Fantini MC, Fina D, Pallone F. Inmunología de las enfermedades inflamatorias intestinales. MA Gassull, F. Gomollón, A. Obrador, J. Hinojosa, eds. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*, 3rd Edn Arán, 2007.
25. Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2007;117:514-21.
26. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007;369:1627-40.
27. Sandborn WJ, Hanauer SB. Antitumor necrosis factor therapy for inflammatory bowel disease: a review of agents, pharmacology, clinical results, and safety. *Inflamm Bowel Dis* 1999;5:119-33.
28. Sandborn WJ. Strategies for targeting tumour necrosis factor in IBD. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:105-17.
29. Kirman I, Whelan RL, Nielsen OH. Infliximab: mechanism of action beyond TNF-alpha neutralization in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:639-41.
30. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005;353:2462-76.
31. Eigler A, Sinha B, Hartmann G, Endres S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol Today* 1997;18:487-92.
32. Suryaprasad AG, Prindiville T. The biology of TNF blockade. *Autoimmun Rev* 2003;2:346-57.
33. Hochberg MC, Lebowitz MG, Plevy SE, Hobbs KF, Yocum DE. The benefit/risk profile of TNF-blocking agents: findings of a consensus panel. *Semin Arthritis Rheum* 2005;34:819-36.
34. Hoentjen F, van Bodegraven AA. Safety of anti-tumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2009;15:2067-73.
35. Brown SL, Greene MH, Gershon SK, Edwards ET, Braun MM. Tumor necrosis factor antagonist therapy and lymphoma development: twenty-six cases reported to the Food and Drug Administration. *Arthritis Rheum* 2002;46:3151-8.
36. Choi B, Hwang Y, Kwon HJ, et al. Tumor necrosis factor alpha small interfering RNA decreases herpes simplex virus-induced inflammation in a mouse model. *J Dermatol Sci* 2008;52:87-97.
37. Behlke MA. Chemical modification of siRNAs for in vivo use. *Oligonucleotides* 2008;18:305-19.
38. Watts JK, Deleavey GF, Damha MJ. Chemically modified siRNA: tools and applications. *Drug Discov Today* 2008;13:842-55.
39. Sioud M, Haoudi A. RNA interference. *J Biomed Biotechnol* 2006;2006:89018.
40. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411:494-8.
41. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002;296:550-3.
42. Lee NS, Dohjima T, Bauer G, et al. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol* 2002;20:500-5.
43. Couzin J. Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash. *Science* 2002;298:2296-7.
44. Sioud M. Therapeutic siRNAs. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:22-8.

45. Layzer JM, McCaffrey AP, Tanner AK, Huang Z, Kay MA, Sullenger BA. In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA* 2004;10:766-71.
46. Palliser D, Chowdhury D, Wang QY, et al. An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection. *Nature* 2006;439:89-94.
47. Avino A, Guimil GR, Albericio F, et al. New carbamate supports for the preparation of 3'-amino-modified oligonucleotides. *Bioorg Med Chem* 1996;4:1649-58.
48. Sorensen DR, Leirdal M, Sioud M. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J Mol Biol* 2003;327:761-6.
49. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993;69:238-49.
50. Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 1998;114:385-91.
51. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 1984;87:1344-50.
52. Dussault AA, Pouliot M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biol Proced Online* 2006;8:1-10.
53. Jackson AL, Linsley PS. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:57-67.
54. Boyum A. Separation of white blood cells. *Nature* 1964;204:793-4.
55. Sioud M, Sorensen DR. Cationic liposome-mediated delivery of siRNAs in adult mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;312:1220-5.
56. Sioud M. Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization. *J Mol Biol* 2005;348:1079-90.
57. Cekaite L, Furset G, Hovig E, Sioud M. Gene expression analysis in blood cells in response to unmodified and 2'-modified siRNAs reveals TLR-dependent and independent effects. *J Mol Biol* 2007;365:90-108.
58. Zuo L, Huang Z, Dong L, et al. Targeting delivery of anti-TNF α oligonucleotide into activated colonic macrophages protects against experimental colitis. *Gut* 2010;59:470-9.
59. Behlke MA. Progress towards in vivo use of siRNAs. *Mol Ther* 2006;13:644-70.
60. Judge A, MacLachlan I. Overcoming the innate immune response to small interfering RNA. *Hum Gene Ther* 2008;19:111-24.
61. Judge AD, Bola G, Lee AC, MacLachlan I. Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. *Mol Ther* 2006;13:494-505.
62. Lorenz C, Hadwiger P, John M, Vornlocher HP, Unverzagt C. Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells. *Bioorg Med Chem Lett* 2004;14:4975-7.
63. Robbins M, Judge A, MacLachlan I. siRNA and innate immunity. *Oligonucleotides* 2009;19:89-102.
64. Zhang Y, Cristofaro P, Silbermann R, et al. Engineering mucosal RNA interference in vivo. *Mol Ther* 2006;14:336-42.
65. Herdewijn P, Saison-Behmoaras E, Van Aerschot A, Leserman L, Eritja R, Pfeleiderer W. Antisense oligonucleotides as anticancer agents. *Biomedical and Health Research*. 1998;24:182-189.
66. Kojouharoff G, Hans W, Obermeier F, et al. Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* 1997;107:353-8.
67. Olson AD, DelBuono EA, Bitar KN, Remick DG. Antiserum to tumor necrosis factor and failure to prevent murine colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995;21:410-8.
68. Naito Y, Takagi T, Handa O, et al. Enhanced intestinal inflammation induced by dextran sulfate sodium in tumor necrosis factor- α deficient mice. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:560-9.
69. Kassiotis G, Kollias G. Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor

- necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination. *J Exp Med* 2001;193:427-34.
70. Vijay-Kumar M, Wu H, Aitken J, et al. Activation of toll-like receptor 3 protects against DSS-induced acute colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:856-64.
 71. Suzuki R, Miyamoto S, Yasui Y, Sugie S, Tanaka T. Global gene expression analysis of the mouse colonic mucosa treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate. *BMC Cancer* 2007;7:84.
 72. Choung S, Kim YJ, Kim S, Park HO, Choi YC. Chemical modification of siRNAs to improve serum stability without loss of efficacy. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;342:919-27.
 73. Robbins M, Judge A, Liang L, McClintock K, Yaworski E, MacLachlan I. 2'-O-methyl-modified RNAs act as TLR7 antagonists. *Mol Ther* 2007;15:1663-9.
 74. Kariko K, Buckstein M, Ni H, Weissman D. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity* 2005;23:165-75.
 75. Salomon W, Bullock K, Lapierre J, Pavco P, Woolf T, Kamens J. Modified dsRNAs that are not processed by Dicer maintain potency and are incorporated into the RISC. *Nucleic Acids Res* 2010;38:3771-9.
 76. Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 2002;26:199-213.
 77. Ma Z, Li J, He F, Wilson A, Pitt B, Li S. Cationic lipids enhance siRNA-mediated interferon response in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;330:755-9.
 78. Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, et al. Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 2005;11:263-70.
 79. Heidel JD, Hu S, Liu XF, Triche TJ, Davis ME. Lack of interferon response in animals to naked siRNAs. *Nat Biotechnol* 2004;22:1579-82.
 80. Di SA, Ciccocioppo R, Cinque B, et al. Defective mucosal T cell death is sustainably reverted by infliximab in a caspase dependent pathway in Crohn's disease. *Gut* 2004;53:70-7.
 81. Luger A, Lebedez P, Koch S, Kucharzik T. Apoptosis as a therapeutic tool in IBD? *Ann N Y Acad Sci* 2006;1072:62-77.
 82. Marini M, Bamias G, Rivera-Nieves J, et al. TNF-alpha neutralization ameliorates the severity of murine Crohn's-like ileitis by abrogation of intestinal epithelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8366-71.
 83. Mizoguchi E, Hachiya Y, Kawada M, et al. TNF receptor type I-dependent activation of innate responses to reduce intestinal damage-associated mortality. *Gastroenterology* 2008;134:470-80.
 84. Zhang DK, He FQ, Li TK, et al. Glial-derived neurotrophic factor regulates intestinal epithelial barrier function and inflammation and is therapeutic for murine colitis. *J Pathol* 2010;222:213-22.



***Discusión
general***

Discusión general

En la actualidad la Enfermedad de Crohn (CD) y la Colitis Ulcerosa (UC) disponen de tratamientos paliativos, únicamente orientados a mejorar la calidad de vida de los pacientes. En casos extremos, la práctica de una colectomía resulta la única alternativa. Por ello, la investigación en busca de nuevas estrategias terapéuticas, eficaces y carentes de efectos adversos, resulta un objetivo prioritario. Entre ellas, los **agentes biológicos**, los **probióticos** y la **leucoféresis** destacan como ejemplos de las *terapias emergentes*. Aunque todos representan avances significativos, usados individualmente no consiguen eliminar por completo la enfermedad. Por tanto, parece evidente, que ante un desorden multifactorial tan complejo como es la IBD, y una población de pacientes tan heterogénea sea necesario el empleo de terapias combinadas e individualizadas.

Entre las nuevas estrategias terapéuticas destaca la terapia génica que tiene por objeto incrementar la expresión de un gen terapéutico mediante el uso de vectores, virales o no virales, y que puede circunscribir la expresión del gen terapéutico de manera específica a determinadas células diana. Para ello, el uso de vectores virales, provistos idealmente de tropismo intestinal, capaces de transducir enterocitos diferenciados y de expresar genes de interés (citocinas antiinflamatorias, moléculas supresoras de la actividad de citocinas proinflamatorias, *etc.*) se perfila como una alternativa prometedora [1]. Del mismo modo, el empleo de forma sistémica o local de vectores no virales (plásmidos o siRNA's), efectivos y seguros, capaces de alcanzar niveles elevados y sostenidos de genes de interés o de silenciar eficazmente la expresión génica, podría soslayar las limitaciones encontradas hasta la fecha con las terapias vigentes.

Nuestro proyecto plantea nuevas aproximaciones a la terapia génica de la IBD pensadas para responder a los requerimientos indicados anteriormente.

1.- Terapia génica gastrointestinal

El tracto gastrointestinal posee características propias que lo hacen una diana atractiva para la terapia génica. En primer lugar, es de fácil acceso (a través de las vías oral o intrarectal). Asimismo, el epitelio intestinal representa una superficie amplia y con gran capacidad de absorción; además, se conoce la localización de las células madre en las criptas intestinales. Las células epiteliales intestinales son capaces de secretar proteínas/hormonas a la circulación general. También se ha demostrado que los linfocitos T intraepiteliales, de placas de Peyer y de *lamina propria* de colon, son capaces de producir citocinas inmunomoduladoras como la IL-10 en grandes cantidades tras estimulación reiterada [2, 3]; en este sentido, el empleo de vectores de terapia génica que contengan el gen de la IL-10 podría ser una herramienta prometedora [4].

2.- IL-10 como molécula terapéutica

La citocina IL-10 posee efectos inmunoreguladores complejos que se describen en apartados anteriores (ver introducción y capítulo 1).

Los ratones genéticamente deficientes en IL-10 (KO IL-10) constituyen un buen modelo animal, sin duda el más elegante, para estudiar la implicación de esta citocina en la patogenia de la IBD. En este modelo la colitis parece ser debida primariamente a un defecto de la función barrera intestinal [5, 6], puesto que la patología sólo aparece en presencia de la microbiota. Secundariamente, la falta de IL-10 puede exacerbar la respuesta inmune. Tanto los animales KO IL-10 como los ratones deficientes en el receptor de IL-10 de tipo 2 desarrollan una colitis mediada por células T_H1 muy similar a la EC [5, 7], lo que hizo pensar que la IL-10 pudiera ser una molécula de gran potencial terapéutico para la IBD. La administración de IL-10 recombinante humana (IL-10rhu) o de vectores adenovirales codificantes del gen de la IL-10 murina (Ad5mulL-10) tanto de forma sistémica [8, 9] como local (por administración intrarectal) en ratones KO IL-10 [6], demostró ser beneficiosa para prevenir el desarrollo de la colitis. Esta administración intrarectal indujo una mayor producción de IL-10 en colon (sin incrementar la producción de IL-10 en hígado o bazo) y mejoró la colitis, sin mostrar los efectos sistémicos observados tras su administración intravenosa [6]. Por ello se consideró terapéutica para la colitis establecida en ratones KO IL-10 durante el periodo de observación (28 días). Por el contrario, en la mayoría de estudios este tratamiento no resultaba curativo cuando la colitis ya estaba establecida [10-15]. El hecho de que el efecto beneficioso se prolongue durante cuatro semanas sugiere que el mecanismo de acción de la IL-10 se extiende más allá de una supresión local de la liberación de citocinas proinflamatorias. Una situación similar se observó en el modelo murino de artritis inducida por colágeno, en el que una administración intra-articular de AdmulL-10 resultó terapéutica tanto para la articulación tratada como para la contralateral [16].

En otros modelos de inflamación intestinal, la administración intravenosa de IL-10 logró inhibir las respuestas proinflamatorias de linfocitos T_H1 y suprimir la colitis tanto en los modelos de DSS como en los de transferencia celular -CD4⁺ CD45RB^{high} a ratones SCID- [15, 17]. Asimismo, la sobreexpresión de IL-10 causada por la administración intravenosa [9] o intraperitoneal [14] de Ad5mulL-10, posterior a la inducción de la colitis murina por DSS, fue capaz de revertir dicha colitis, por lo que se la consideró una buena herramienta para su uso en la terapia de la IBD.

La administración oral de bacterias no patógenas, *L. lactis*, modificadas genéticamente para producir IL-10 murina logró una mejoría histológica en los modelos de DSS y KO IL-10 [18]. Sin embargo, ha generado mucha controversia el uso y la liberación al medio ambiente de organismos vivos genéticamente modificados para terapia humana, en particular porque mantienen su capacidad replicativa. Por ello, el empleo de Ad defectivos (no integrativos) como vectores de terapia génica puede resultar una alternativa ventajosa, libre de estos inconvenientes.

Los estudios preclínicos dibujan pues unas perspectivas prometedoras para el uso de la IL-10 como tratamiento de la IBD, si bien es cierto que sus beneficios parecen depender del microambiente local, de la célula diana, del estadio de la enfermedad y de la concentración de la propia citocina que se alcanza [19].

La IL-10 exógena es capaz de disminuir la liberación de citocinas proinflamatorias por células mononucleares de *lamina propria* (LPMC's) en tejido de pacientes de CD [20]. No obstante, cuando se empleó la IL-10rhu (Tenovil, Schering-Plough) en estudios clínicos con pacientes de IBD los resultados demostraron que era bien tolerada pero poco eficaz [21-23], posiblemente debido a una insuficiente penetración en la mucosa intestinal para inhibir la respuesta inflamatoria local, a una semivida biológica de la citocina relativamente corta e incluso a la existencia demostrada de polimorfismos en sus receptores [24]. En contrapartida, la administración por vía sistémica de dosis mayores de IL-10 puede presentar inconvenientes por la indefensión en la que queda el paciente frente a ciertos patógenos. Se ha especulado también que altas dosis de IL-10 podrían favorecer el desarrollo de neoplasias por inhibición de las reacciones inmunes antitumorales y por las propias funciones tróficas de la citocina [19, 25].

Por consiguiente, parece imprescindible encontrar estrategias alternativas capaces de dar lugar a una mayor expresión de IL-10, de forma que en el tracto digestivo se alcancen concentraciones de dicha citocina que puedan frenar el proceso inflamatorio. Con este objetivo decidimos examinar la eficacia terapéutica sobre la colitis inducida por DSS de dos vectores de terapia génica capaces de inducir sobreexpresión hepática de IL-10.

3.- Terapia génica con IL-10

Este estudio terapéutico se ha centrado en probar una administración sistémica de vectores de expresión de la molécula mL-10, previa a la inducción de la colitis murina. Los vectores empleados, un Ad5 replicación-defectivo y un plásmido carente de motivos inmunoestimuladores CpG han sido utilizados en un estudio comparativo para establecer no sólo el potencial terapéutico de la IL-10 en nuestro modelo de IBD, sino que además nos permitió comparar la relación de la eficacia terapéutica con los niveles de IL-10 alcanzados (*submitted manuscript, J. of Gene Med*). La falta de estudios preclínicos que aporten una relación directa entre los niveles de IL-10 en sangre y el beneficio terapéutico obtenido, así como la falta de estudios experimentales realizados por períodos de tiempo lo suficientemente largos [9, 10, 13, 14], no han permitido verificar las consecuencias del tratamiento con una molécula potencialmente inmunosupresora como la IL-10 ni los efectos del propio vector adenoviral en un escenario inmunocomprometido. Por estos motivos nos pareció necesario el diseño de este estudio, ampliando la observación clínica a 15 días.

Los resultados de este primer estudio indican que durante la primera semana post-tratamiento la eficacia terapéutica alcanzada fue similar con ambos vectores de expresión de IL-10 (*figuras 2 y 3, capítulo 1*). Tanto el DAI, el acortamiento colónico, la actividad MPO y el

HS se vieron mejorados significativamente comparado con los animales colícticos no tratados. Estos resultados iban en consonancia con estudios previos [6, 8-10, 13, 14]. Sin embargo, cuando tratamos de valorar qué sucedía al ampliar el período de observación una semana más, obtuvimos un 70% de mortalidad en el grupo de animales colícticos tratados con Ad5IL-10 (*figura 4G, capítulo 1*). Este hallazgo fue totalmente inesperado ya que parecía que la eficacia terapéutica con ambos tratamientos era similar y el DSS había sido retirado unos 5 días antes. Por tanto, las posibles causas de esta mortalidad tardía eran, o bien una inmunosupresión generalizada causada por los elevados niveles sistémicos de IL-10 en el grupo Ad5IL-10, o bien por la posible toxicidad debida a la administración intravenosa del vector adenoviral. Habida cuenta de que no hallamos niveles de IL-10 significativamente más altos en el grupo tratado con el Ad5IL-10 con respecto a los niveles de los controles sanos a días 7 y 15, descartamos la primera hipótesis. Además, la concentración de IL-10 alcanzada con el PI/IL-10 duplicó a la obtenida con el Ad5IL-10 a los 7 y 15 días (*figura 7, capítulo 1*) y sin causar toxicidad. Es bien sabido que la administración intravenosa de Ad5 clásico promueve la producción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas de forma dosis-dependiente [13, 26-28], causando una respuesta inflamatoria generalizada y una activación de la respuesta inmune innata, que parecen haber contribuido a la elevada mortalidad. De hecho, la infiltración leucocitaria hepática (*figura 5, capítulo 1*) observada exclusivamente en los animales tratados con el Ad (tanto con Ad5IL-10 como con el Ad nulo) respalda esta hipótesis. La existencia combinada de proteínas inmunogénicas en la cápside adenoviral, junto con la presencia de la citocina inmunoreguladora IL-10, además de la respuesta inflamatoria generada tras la administración sistémica del vector, así como la promoción de señales antiapoptóticas en las células transducidas ejercida por el Ad [29], parecen ser las causas de la toxicidad tardía observada. Esta toxicidad adenoviral puede además verse incrementada por el ambiente inflamatorio existente, la desestabilización de la barrera intestinal y la reducción de la actividad de los macrófagos a causa del DSS, lo cual puede favorecer la traslocación bacteriana y el desarrollo de sepsis.

Al igual que sucede con los adenovirus, son numerosos los estudios que emplean plásmidos como vehículo de genes [30-42], mediante administración hidrodinámica o no, aunque en ningún caso se han empleado como vectores de terapia génica dirigida al intestino. Por tanto, nuestro estudio en ratones colícticos es el primero en demostrar eficacia terapéutica tras la administración hidrodinámica de un PI/IL-10 CpG-free. La administración hidrodinámica de este pDNA fue capaz de promover la producción del gen terapéutico en hígado, lo cual se tradujo en una mejoría clínica en los animales. Quince días después de dicha administración aún se encontraban concentraciones elevadas de IL-10 a nivel sistémico, período de tiempo en el cual los niveles de MPO y el HS aún eran significativamente menores en este grupo con respecto a los animales colícticos no tratados. En contraste con otros estudios [9, 15] hemos logrado demostrar diferencias significativas en

cuanto a la ganancia de peso corporal diario en los animales colíticos tratados (*figuras 2 y 4, capítulo 1*).

En otros ensayos sobre el modelo de colitis inducida por administración de DSS al 3% en ratones C57BL/6 se ha descrito una regeneración incompleta del epitelio colónico 3-4 semanas después de retirar el DSS, con presencia aún de microúlceras [43]. Este proceso difiere del observado en ratones BALB/c, en los que se produce una resolución espontánea de la enfermedad a nivel macro- y microscópico, una semana después de retirar el DSS [43]. Interesa resaltar, por tanto, que el hecho de que en nuestros experimentos hayamos observado regeneración epitelial en colon 2 días después de retirar el DSS en los animales colíticos tratados con Ad5IL-10 o Pl/IL-10 a diferencia de los animales colíticos no tratados, es un importante indicio del efecto beneficioso de la molécula terapéutica.

En 2007, *Sakurai y col.* [44] compararon por primera vez dos vectores de expresión génica diferentes, un Ad clásico y un plásmido con motivos CpG conjugado con lípidos (*lipoplex*), administrados por vía sistémica, en cuanto a niveles de expresión alcanzados, toxicidad y generación de respuesta inmune en el huésped. Estos autores vieron que los Ad eran capaces de obtener niveles de 2 a 5 órdenes de magnitud superiores que el *lipoplex* y que, sorprendentemente, el *lipoplex* resultaba más tóxico que el Ad (dando lugar a una mayor producción de TNF α , IL-6, IL-12 a las 6 horas post-inyección), pero el nivel de hepatotoxicidad era similar con ambos vectores. Las diferencias en términos de expresión entre ambos vectores se pueden explicar por su diferente capacidad de transfección/transducción: los *lipoplex* son eficientes en la transfección de células en división; en cambio los Ad pueden transducir tanto células en división como quiescentes. El resultado más trascendente fue que la producción de estas citocinas proinflamatorias podía ser completamente suprimida si se eliminaban los motivos inmunoestimuladores CpG en el pDNA. *Sakurai y col.* concluyeron, por tanto, que el Ad era más efectivo en niveles de expresión y más seguro en cuanto a menor producción de citocinas proinflamatorias y en la generación de un daño hepático más tardío que el *lipoplex* con motivos CpG, contrariamente a lo que hemos observado en nuestro estudio. Por tanto, nuestros resultados confirman que el éxito en el diseño del Pl/IL-10 CpG-free es capaz de soslayar las desventajas encontradas hasta la fecha para lograr una expresión eficaz del gen terapéutico utilizando plásmidos como vectores.

En este estudio hemos explorado el potencial terapéutico de una única administración intravenosa de un Ad5IL-10 o un Pl/IL-10 CpG-free para reducir la inflamación intestinal empleando el modelo de colitis inducida por DSS, así como sus efectos a corto y medio plazo. Nuestros resultados indican que esta administración no fue capaz de prevenir el desarrollo de la colitis, pero sí de mejorar significativamente sus manifestaciones clínicas más relevantes así como de retrasar el inicio de dicha inflamación por un lapso de dos días (*figuras 2B y 4B, Capítulo 1*).

En conclusión, este estudio demuestra que se pueden alcanzar niveles sistémicos, elevados y sostenidos de IL-10 con un diseño apropiado de plásmidos y que dichos niveles tienen valor terapéutico en el modelo de colitis inducida por DSS. Pese a los efectos beneficiosos iniciales obtenidos con el Ad5IL-10, los vectores adenovirales con tropismo hepático parecen promover importantes efectos tóxicos de aparición tardía al ser administrados por vía sistémica, sobre todo en presencia de un ambiente inflamatorio. Nuestros resultados redefinen por tanto, el valor terapéutico de la IL-10 para el tratamiento de la IBD. En este sentido, las alternativas que parecen más prometedoras son la administración de vectores no virales de expresión de IL-10 con un diseño apropiado que permita soslayar la respuesta inmune innata. Alternativamente, el rediseño de vectores virales para disminuir su tropismo hepático y aumentar el tropismo intestinal se perfila como una buena opción de cara a reducir los efectos tóxicos de los vectores adenovirales en un contexto inflamatorio.

4.- Efecto de la IL-10 sobre la eficacia de las readministraciones del vector terapéutico adenoviral

El objetivo de la mayor parte de estudios de terapia génica es tratar enfermedades, genéticas o no, que tienen un curso prolongado. Los Ad del grupo C, Ad5 y Ad2, asociados a enfermedades humanas benignas, son los empleados mayoritariamente para desarrollar vectores de terapia génica. En la mayoría de los casos se requerirá una expresión prolongada del transgén y una reducción de la respuesta inmune generada por el vector, de modo que las readministraciones continúen dando efectos terapéuticos. Estos son sin duda los mayores inconvenientes a superar.

La respuesta inmune contra los Ad es el factor limitante más importante para su posible uso en clínica [45]. El desarrollo en el huésped de respuestas tanto celulares, que eliminan la célula transducida, como humorales (inmunoglobulinas que reconocen proteínas de la capsida viral) imposibilitan las readministraciones del vector [26, 27, 45-48]. Estudios previos en roedores demostraron la existencia de respuestas inmunes específicas capaces de limitar la eficacia de la transferencia génica en una segunda administración del vector adenoviral [49, 50]. Por tanto, es de vital importancia estudiar y conocer estas respuestas.

El propósito de este estudio fue analizar el efecto que la citocina inmunomoduladora IL-10 ejercía sobre las respuestas inmunes adaptativas celulares y humorales del huésped tras tres readministraciones adenovirales en animales inmunocompetentes CD1.

Los resultados de este segundo estudio indican que la IL-10 es capaz de ejercer un efecto inmunomodulador, disminuyendo tanto las respuestas inmunes celulares, al minimizar la proliferación Ag-específica de células del sistema inmune adaptativo, así como las humorales, reduciendo el título de anticuerpos neutralizantes (NAb's) anti-Ad. Asimismo, la capacidad de la IL-10 de desencadenar una supresión T_H1 , y de aumentar el nivel de otras

citocinas T_H2, permiten vislumbrar buenas expectativas en cuanto a su uso como gen terapéutico en estudios que comporten la administración reiterada de vectores adenovirales portadores del gen de IL-10.

Ad5IL-10 como terapia de la IBD

Tras haber logrado un efecto beneficioso con una única administración intravenosa del Ad5IL-10 en la colitis murina inducida por DSS (*capítulo 1*), otro indicador importante de que la administración de AdIL-10 puede ser beneficiosa para el tratamiento de la IBD es su capacidad de bloquear la respuesta de células T *in vitro*, inhibiendo su proliferación y la producción de citocinas proinflamatorias (*capítulo 2*). Pese a que la etiopatogenia de este grupo de enfermedades no está aún bien definida, existe un gran consenso en señalar que en la IBD las células T efectoras CD4⁺ del sistema inmune adaptativo sufren una disregulación reaccionando frente a antígenos propios [51].

En nuestro estudio decidimos evaluar las respuestas esplénicas ya que el bazo, como órgano linfoide secundario, contribuye de forma mayoritaria a la producción de citocinas tras una infección por Ad [52] y por ser el mayor productor de células T y B Ag-específicas. Para ello empleamos cultivos primarios de linfocitos esplénicos murinos, que mantienen la maquinaria del ciclo celular intacta; de esta forma, la activación específica de linfocitos T y B con estímulos apropiados se caracteriza por un aumento en su capacidad proliferativa, dando lugar a la expansión clonal de estas células y la consiguiente producción de citocinas [53].

Las células B y las Ig's también se han visto implicadas en la etiopatogenia de la IBD, sobre todo en la CU. En ella se ha observado que las células plasmáticas aisladas de mucosa colónica son capaces de producir una gran cantidad de Ig's [54]; asimismo, casi el 80% de pacientes muestran anticuerpos de tipo IgG tanto en suero como en mucosa [55]. Por estos motivos decidimos estudiar las respuestas de las células B tras su estimulación selectiva con altas concentraciones de LPS (50 µg/mL) en ratones tratados con varias inyecciones de Ad5IL-10. Su activación induce la proliferación y la liberación de Ig's [56]. Los resultados de este estudio demuestran que la triple administración de Ad5IL-10 produjo una disminución de la capacidad proliferativa de este tipo celular (*figuras 1 y 2B, capítulo 2*) sin comprometer su viabilidad (*figura 3, capítulo 2*), a la vez que causó una reducción en el título de NAb's anti-Ad (*figura 5, capítulo 2*), sugiriendo que este tratamiento podría ser capaz de inhibir las respuestas inmunes tanto celulares como humorales.

El hecho de que el Ad5IL-10 haya sido capaz de modificar el curso de la inmunidad adaptativa es positivo ya que muchas enfermedades inflamatorias, actualmente muy prevalentes, se desarrollan por una activación descontrolada del sistema inmune, en la que participan activamente los linfocitos [19, 57-60]. De todas maneras, para obtener una imagen más completa de los efectos de la administración de Ad5IL-10 sería conveniente analizar el efecto de esta molécula en células de la inmunidad innata, como los macrófagos,

por constituir la primera línea defensiva del organismo. Hemos hallado indicios que sugieren que tras su administración rectal, el Ad quimérico 5/40S podría transducir macrófagos colónicos (*capítulo 3*). Aunque no hemos evidenciado que este tipo celular resulte transducido tras la administración intravenosa u oral del vector, los efectos de una eventual expresión de IL-10 en macrófagos podrían aportar importantes ventajas terapéuticas.

En conclusión, los efectos ejercidos por la IL-10 sobre las respuestas inflamatoria (*capítulo 1*) e inmune adaptativa (*capítulo 2*) demuestran que el Ad5IL-10 podría ejercer acciones tanto inmunomoduladoras como antiinflamatorias *in vivo*, más que actuar como una simple molécula inmunosupresora [61]. Además, la terapia inmunosupresora no ha mostrado efectos beneficiosos en la colitis espontánea de ratones KO IL-10 [62]. Por tanto, una molécula inmunomoduladora, capaz de atenuar los aspectos proinflamatorios de la IBD, pero que además logre restablecer los valores de mediadores antiinflamatorios que participan en los mecanismos de tolerancia inmune, y que permita la administración reiterada de la molécula, debería *a priori* resultar beneficiosa para el tratamiento de una enfermedad crónica como es la IBD.

5.- Estudios de biodistribución y bioseguridad adenoviral

Para que un Ad pueda ejercer el efecto deseado tras su administración como vector de terapia génica ha de ser reconocido por la célula huésped y unirse a ella. En el caso del ampliamente estudiado Ad5, así como para la mayoría de Ad humanos, esta unión inicial virus-célula es mediada por la interacción entre la proteína viral *fiber knob* y el receptor Cocksackievirus y receptor de Ad (CAR), responsable en gran medida de su tropismo natural [63, 64]. Como han demostrado diferentes estudios, la administración intravenosa de un Ad5 recombinante no replicativo produce una transducción mayoritariamente hepática, como resultado de su tropismo natural [8, 65]. Para conseguir un vector de terapia génica dirigido exclusivamente al intestino debíamos lograr modificar el tropismo del Ad5. Basándonos en el hecho de que el Ad40 (especie F) causa gastroenteritis en humanos nos planteamos generar Ad quiméricos que mantuvieran el tropismo intestinal de Ad40, a partir del Ad5. El Ad40 presenta en su cápside dos proteínas *fiber* diferentes. La proteína *fiber L* (larga) se une a CAR, mientras que la proteína *fiber S* (corta) no se une a dicho receptor. La proteína S parece ser la responsable del tropismo intestinal propio del Ad40 salvaje [66]. Así, se generaron diferentes Ad quiméricos 5/40 que contenían modificaciones de proteínas de la cápside y que fueron combinadas con proteínas del Ad40, con el objetivo obtener un vector que presentara un tropismo intestinal para así esquivar los efectos adversos y la elevada toxicidad encontrados hasta entonces (*capítulo 1*).

Nuestros resultados de biodistribución y bioseguridad empleando estos Ad5/40 revelan que el Ad5/40S (virión del Ad5 que contiene la proteína *fiber* corta del Ad40) se perfila como un vector eficaz para transducir el tracto gastrointestinal de forma altamente

selectiva. Asimismo, estudios previos *in vitro* de nuestro grupo demostraron que este Ad5/40S era capaz de infectar eficientemente células epiteliales colónicas humanas (HT29 y Caco-2) [67]. Como se señaló anteriormente, la administración oral o intrarectal de Ad5/40S consiguió una alta transducción en el tracto gastrointestinal, en particular en colon, como muestran los resultados obtenidos por luminometría, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia (*capítulo 3*). La ausencia de efectos adversos tras la administración del vector portador de genes *reporter* no inmunoreguladores, el marcado tropismo intestinal y la eficiente expresión del gen *reporter* a nivel del epitelio del colon sugieren que, incorporando un gen terapéutico adecuado, el Ad5/40S podría ser útil para tratar enfermedades crónicas intestinales como la IBD.

Un dato particularmente interesante es que tras la exposición de los Ad quiméricos a un pH ácido, similar al que se encuentra en la luz gástrica (pH=2, parecido al pH en adultos, pH=4, similar al pH en niños), el Ad5/40S mostró una gran resistencia, e incluso incrementó su capacidad infectiva en 2,5 veces [67, 68]. Esto sugiere que el paso a través del estómago puede favorecer la infección del Ad40 en el tracto gastrointestinal humano y, por tanto, si se deseara emplear un Ad quimérico 5/40 como vector terapéutico mediante su administración oral, no sólo no inactivaría sino que en principio potenciaría la infectividad del vector.

Diversos ensayos efectuados en ratones han demostrado que tras la administración intrarectal de vectores adenovirales, la expresión máxima del gen *reporter* se alcanza al cabo de 48-72 horas [69-71]. Sin embargo, la actividad terapéutica y los niveles del transgén se mantienen altos hasta 7 días o más, a pesar del rápido recambio de las células del epitelio intestinal [6].

Diferentes estudios han demostrado que el Ad5 es incapaz de unirse eficientemente a enterocitos diferenciados [72, 73], en consonancia con nuestros resultados. Así pues, la administración intravenosa, oral o intrarectal del Ad5 se manifestó por una escasa transducción intestinal, mientras que el Ad5/40S mostró una gran eficiencia de transducción en el tracto gastrointestinal por las vías oral e intrarectal (*figura 2, capítulo 3*).

Aunque la administración intrarectal de dicho Ad da lugar a la expresión del gen *reporter* predominantemente en colonocitos, se ha detectado también la proteína codificada por el transgén en LPMCs [65], sobre todo en animales colíticos. En vista del hallazgo de Wirtz *et al.*, y ya que se había demostrado que la transducción adenoviral se veía incrementada tras la erosión epitelial subsiguiente a la inflamación [65], decidimos estudiar la bioseguridad y biodistribución de los Ad quiméricos 5/40, codificantes de los genes *reporter* β -galactosidasa o proteína verde fluorescente (GFP), en ratones CD1 colíticos tras su administración intrarectal. En estos estudios, no observamos signos de toxicidad en los animales colíticos a día 8, tres días después de la administración de los Ad.

Por lo que se refiere a bioseguridad, nuestros resultados indican que los Ad quiméricos ensayados resultan seguros tanto en animales sanos como colíticos, por lo menos cuando el transgén no ejerce efectos inmunomoduladores. De los vectores

ensayados, es el Ad5/40S el que presentó el tropismo que buscábamos. Los resultados de luminometría (*figura 2, capítulo 3*) demuestran que, tras administración intrarectal u oral, la infectividad del Ad5 fue muy escasa en los órganos del tracto gastrointestinal, mientras que el Ad5/40S infectó el colon y el intestino delgado. La administración intravenosa de Ad5GFP dio lugar a una mayor expresión de la GFP en hepatocitos que la alcanzada en este tejido tras administración oral o intrarectal. Tras administración intrarectal u oral del Ad40SGFP se observó abundante expresión de GFP en IEC's de vellosidades y criptas intestinales y en submucosa del intestino delgado y el colon. Como dato más trascendental, el marcaje de algunas de estas células GFP-positivas (con forma de 'pupila de gato') colocalizaba con el de células somatostatina- y cromogranina-positivas (*figuras 5 y 6, capítulo 3*). Esto indica una transducción preferente de las células enteroendocrinas de la mucosa del tracto digestivo. Además, se observó colocalización de GFP en células CD68+ (*figura 7, capítulo 3*). Esto podría indicar o bien que los macrófagos colónicos resultan transducidos por el vector o bien que, dado su carácter fagocítico, los macrófagos colónicos hubieran fagocitado células epiteliales transducidas por el vector.

Estas observaciones tienen varias implicaciones: *en primer lugar*, las células enteroendocrinas tienen un recambio celular más lento que las IEC's permitiendo que la expresión del gen terapéutico sea más duradera; por ello, sería interesante valorar la expresión del gen *reporter* a distintos tiempos post-administración del vector. *En segundo lugar*, en la IBD el número de macrófagos residentes se ve incrementado, por lo que si este tipo celular resultara eficientemente transducido, esto daría oportunidad de modular su función. Asimismo, considerando la localización de las células enteroendocrinas, predominantemente en las vellosidades con su polo basal orientado hacia el lumen intestinal, y dada su capacidad secretora paracrina también dirigida hacia el lumen, estos productos pueden permanecer en el entorno en el que se están produciendo los efectos deletéreos derivados de la estimulación de macrófagos, linfocitos y colonocitos.

En tejido colítico se ha evidenciado la presencia de una hiperplasia de células enteroendocrinas [74, 75], que también se ha puesto de manifiesto por la elevada inmunoreactividad hacia la cromogranina en los estudios de colocalización (*figura 5, capítulo 3*). No obstante, la aparente reducción apreciada en el número de células somatostatina-positivas en el colon inflamado *versus* colon control (*figura 6, capítulo 3*) puede estar relacionada con observaciones previas que indican que este tipo de células enteroendocrinas en particular disminuye en la IBD [76].

Los resultados que se obtuvieron al analizar por luminometría los tejidos de animales colíticos tratados con Ad5 β -gal fueron poco consistentes. Con el fin de determinar si la actividad β -galactosidasa cuantificada por luminometría provenía exclusivamente de la transducción del Ad, y descartar que procediera de la flora intestinal, realizamos en paralelo un estudio microbiológico y luminométrico con tejidos (hígado, íleon, ciego y colon) de ratones sanos y colíticos que no recibieron Ad5 β -gal. En este ensayo se evidenció que en los

tejidos gastrointestinales de animales colícticos puede encontrarse actividad β -gal procedente de bacterias adheridas a la mucosa o que han translocado al espacio submucoso. La utilización de diferentes condiciones ‘bacteriolíticas’, como la sonicación o la adición de lisis buffer, reducía el número de colonias β -gal positivas que se desarrollaban cultivando los extractos tisulares en agar MCKonkey (figs. 9 y 10, capítulo 3), pero no se eliminaba totalmente la contaminación del tejido con β -gal de origen bacteriano. Estos resultados demostraron que las lecturas de luminometría de los tejidos de animales colícticos tratados con vectores de expresión de β -gal no son fiables, por lo que no estamos en condiciones de aportar valores cuantitativos para describir la biodistribución en animales colícticos. Por el contrario, en tejido de animales sanos el *flushing* elimina eficazmente las bacterias adheridas al mucus y, por tanto, la β -gal derivada de la microbiota; así, la cuantificación realizada por luminometría es precisa y fiable. Por tanto, por lo que respecta a la eficiencia de transducción de los Ad en muestras de tejido de animales colícticos, los únicos resultados fiables de los que disponemos son los de microscopia de fluorescencia y los resultados obtenidos, que sugieren una mayor transducción en animales colícticos (figuras 5-7, capítulo 3).

Este estudio demuestra que la introducción de la proteína *fiber* corta (F40S) del Ad40 para la generación de Ad quiméricos 5/40 reduce el tropismo natural del Ad5 hacia el hígado, potenciando su biodistribución hacia el colon.

Por tanto, nuestros resultados sugieren que el Ad quimérico 5/40S podría ser un vector idóneo para expresar genes terapéuticos de forma eficaz y selectiva. Además, el empleo de este vector ofrece la posibilidad de ser administrado por vía entérica, soslayando así los efectos tóxicos del Ad5 (capítulo 1) y reduciendo, presumiblemente, la respuesta inmune del huésped tras las readministraciones (capítulo 2).

6.- Silenciación de TNF α (siRNA anti-TNF α) como estrategia terapéutica

El factor de necrosis tumoral *alpha* (TNF α) ha sido considerado durante décadas una molécula relevante en la patogenia de la IBD [77-80]. Por ello, se han probado diversas estrategias para inhibir su acción proinflamatoria y así conseguir un efecto terapéutico tanto en modelos experimentales de estas patologías [17, 81-87] como en la clínica [88-98]. Actualmente son varios los agentes biológicos anti-TNF α que se han introducido en la clínica diaria, algunos con un uso bastante extendido para el tratamiento de afecciones como la artritis o la IBD.

La interferencia de RNA (RNAi) hace referencia a un proceso de silenciamiento génico post-transcripcional con prometedoras aplicaciones terapéuticas. Sin embargo, para que pueda ser empleada en la práctica se ha de poder garantizar la especificidad de su acción y la ausencia de efectos deletéreos [99, 100].

Por estos motivos decidimos evaluar la potencia silenciadora y terapéutica de diferentes dúplex de siRNA, sin modificar (*i.e.*, siTNF) o modificados químicamente (*i.e.*, siTNF-OMe y siTNF78) en su cadena *sense*, y dirigidos frente al TNF α murino en el modelo de colitis por DSS en ratón. Utilizando DSS al 5% durante 5 días en ratones C57BL/6 se ocasiona una colitis severa con presencia de sangre en heces desde las primeras 24-48 horas. En este modelo la administración local (intrarectal) del siTNF78 (OMe-propandiol) a día 2 y día 4 en combinación con lípidos catiónicos (optimem[®] y lipofectamina[™] 2000), produjo una mejora significativa en el DAI, el acortamiento colónico y la ratio peso/longitud del colon, la actividad MPO y el HS (a días 5 y 8 post-inducción de la colitis) (*figuras 3, 4, 5 y 6, capítulo 4*). Asimismo, después de una única administración intrarectal, el siTNF78 fue capaz de reducir los niveles de mRNA de TNF α en extractos de colon distal en un 47% en comparación con los animales colíticos tratados con siScr-OMe a día 3 (16 horas después de la administración del siRNA) (*figura 7, capítulo 4*).

Los efectos beneficiosos se manifestaron exclusivamente a nivel local, como indica el hecho de que los niveles séricos de SAA y TNF α se encuentren inalterados; es decir, elevados en todos los grupos con colitis (*tabla 4 y figura 8, capítulo 4*). Este tratamiento no dio lugar a efectos tóxicos significativos y no se evidenciaron respuestas inmunes inespecíficas (*i.e.*, efectos *off-target*). Así pues, el siTNF78 se muestra como una molécula prometedora para el desarrollo de fármacos de aplicación mucosa para su uso *in vivo*.

Las modificaciones químicas 2'-O-metil y propandiol del siTNF78 confirieron a la molécula una potente actividad silenciadora de la citocina TNF α tanto *in vitro* (*figura 1, capítulo 4*) como *in vivo* (*figura 7, capítulo 4*), mayor que la lograda con las otras moléculas siRNA ensayadas (siTNF y siTNF-OMe).

El incremento de la estabilidad conferida por esta doble modificación es una causa probable de las ventajas del siTNF78. Además, esta doble modificación redujo la capacidad inmunoestimuladora de la molécula tanto *in vitro* sobre PBMC's humanas (*figura 9, capítulo 4*) como *in vivo* en ratones colíticos (*figura 10, capítulo 4*), lo que resultaría ventajoso para su eventual uso terapéutico.

Tras la doble administración intrarectal del siTNF78 a ratones colíticos, a día 2 y día 4 del inicio de dicha colitis, se observó una mejoría en la evolución de la colitis tanto a día 5 (*figuras 3 y 4, capítulo 4*) como a día 8 (*figura 5 y 6, capítulo 4*). Esta mejoría parece depender de una reducción en los niveles de TNF α detectados en colon distal por RT-PCR cuantitativa, que si bien sólo se vieron significativamente disminuidos 16 horas después de la administración del siTNF78 (*figura 7, capítulo 4*) parecen tener una importante repercusión en el proceso colítico. Esto puede ser debido a la interrupción de mecanismos de *feed-back* positivo, alimentados por el TNF α , que acabarían atenuando el proceso inflamatorio a nivel local. El hecho de que a día 8 los niveles de TNF α sean menores que a día 5 ponen de manifiesto la atenuación de la inflamación causada por la doble administración del siRNA78. Otro hallazgo que demuestra los beneficios de la molécula es la mayor

supervivencia observada en los animales tratados con siTNF78; las tasas de mortalidad fueron del 42%, 32%, 19% y 16% a día 5, y del 75%, 37.5%, 41.6% y 33% a día 8 en los grupos siTNF, siScr-OMe, siTNF-OMe y siTNF78, respectivamente), lo que indica que la introducción de varias modificaciones incrementa el potencial terapéutico de la molécula. Asimismo, los efectos beneficiosos encontrados a nivel local (HS, expresión de TNF α) se correlacionan con un efecto beneficioso general (mortalidad reducida, reducción del DAI), pese a no haber encontrado diferencias en los niveles séricos de SAA [101] y TNF α comparados con los animales control (tabla 4 y figura 8, capítulo 4).

Si bien Ramratnam y col. [102] demostraron que la doble administración intrarectal de un siRNA TNF α no modificado, a días 0 y 2, disminuye los niveles de mRNA de esta citocina y mejora el índice histológico en ratones con colitis inducida por DSS al 5%, pero sin lograr mejorar otros parámetros clínicos de la enfermedad, nuestros estudios muestran que con la utilización del siTNF78 doblemente modificado y con la misma secuencia a la empleada por Zhang *et al.* sí se consigue una mejoría clínica significativa. Estas diferencias pueden atribuirse a la incorporación de las modificaciones 2'-O-metil y propandiol en la cadena *sense* del siTNF78 que confieren un mayor efecto terapéutico, pero también a otros factores. Entre ellos, el *timing* en la administración (Zhang *et al.* administran la molécula a día 0 y día 2 *versus* a día 2 y día 4 en nuestro estudio). El hecho de administrar el siRNA cuando ya existe disrupción epitelial puede haber favorecido la penetración de la molécula y por tanto contribuir a los efectos beneficiosos observados en nuestros ensayos.

El análisis de la expresión génica empleando micromatrices (*microarrays*) nos permitió comparar la expresión de los genes alterados por la colitis inducida por DSS al 5% así como las diferencias encontradas tras el tratamiento intrarectal, a días 2 y 4 post-inducción de la colitis, con los diferentes siRNA's anti-TNF α . Para este estudio se empleó RNAm extraído de la porción distal del colon de ratones pertenecientes a los 5 grupos experimentales. En total se analizaron 25.000 genes de la base de datos UniGene; de estos, unos 3.800 se encontraban alterados al comparar el RNAm de animales sanos y colíticos, pero sólo 60 se hallaron exclusivamente modulados por el tratamiento con siTNF78 y la mayoría de ellos estaban inalterados en comparación con los controles sanos. Con este tratamiento se logró pues estimular a la alza los genes implicados en procesos de reparación tisular y funcionamiento normal del colon, y disminuir los relacionados con la inflamación y respuesta inmune innata, entre ellos la estimulación *off-target* de TLR's. Esto indica que la doble modificación en la cadena *sense* del dúplex es capaz de bloquear la activación del sistema inmune comparado con los demás siRNA's, en nuestras condiciones experimentales.

Otro resultado significativo en este análisis fue la detección de niveles elevados de IL-10 y bajos de IFN- γ en el colon de los ratones tratados con siTNF78, en comparación con el resto de grupos. El aumento de la IL-10 tras el tratamiento con el siTNF78 fue independiente de la activación de IFN de tipo I [103]. Este resultado indica que el tratamiento con el siTNF78 disminuye la activación de genes proinflamatorios y por el contrario aumenta la de

los antiinflamatorios, probablemente como consecuencia de la inhibición temprana del TNF α en este modelo. Además, el efecto del siTNF78 se manifestó también con ausencia de activación de la vía de regulación positiva de la producción de TNF α (*Ibp*, *ticam1*, *nod1*, *nod2*, *tlr2*, *tlr3*, *tlr4*, *myd88*, entre otros) que sólo se veía activada con el siScr-OMe.

Mediante este análisis de la expresión génica hemos comparado la respuesta al tratamiento con diferentes moléculas siRNA anti-TNF α modificadas y sin modificar, encontrándose alrededor de 850 genes alterados por los diferentes tratamientos. Entre ellos, un gran número están implicados en las respuestas inmunes innatas y adaptativas, aunque la mayor proporción de ellos estaban alterados como respuesta al tratamiento con el siScr-OMe y el siTNF; en cambio con el tratamiento con siTNF78 no se detectaron alteraciones en genes implicados en mecanismos *off-target*, siendo acorde a los resultados publicados por *Cekaite y col.* [104] y confirmando además la especificidad de la molécula terapéutica y la ausencia importante de efectos adversos no deseados [105-110].

La administración de siRNA's empleando liposomas como vehículo es capaz de conferir a la molécula propiedades inmunoestimuladoras [111] y, tras ser administrados en ratones, son capaces de inducir importantes respuestas inmunes sistémicas con producción de IFN's de tipo I [110, 112, 113]. Por el contrario, la administración de siRNA's desnudos no modificados o siRNA's conjugados con colesterol no demostró efecto inmunoestimulador [114]. Nuestros resultados indican que ninguno de los siRNA's anti-TNF α modificados químicamente o no pero conjugadas con DOTAP estimuló la producción de TNF α en PBMC's humanas (valor medio máximo de 1188 pg/mL para el siTNF a 50 nM, conjugado con DOTAP) al compararlos con las secuencias siRNA inmunostimuladoras descritas por *Sioud et al.* (aproximadamente, 1800 pg/mL con 50 nM de siRNA no conjugado con DOTAP) [113]. En este estudio describen que la combinación con DOTAP induce un aumento de 7 veces en los niveles del TNF α producidos por las PBMC's tras el tratamiento con siRNA's; en cambio, nuestros resultados demuestran que la adición de siTNF78 (a 10, 20 o 50 nM) a PBMC's en cultivo no indujo cambios significativos en los niveles de TNF α , demostrando una vez más la ausencia de efectos *off-target*. En este mismo trabajo, *Sioud* y colaboradores describen que los siRNA's de doble cadena comportan una menor estimulación del sistema inmune que sus homólogos de cadena sencilla *sense* o *antisense*, incluso si se vehiculan combinados con lípidos.

En este sentido, ha sido demostrado que la introducción de modificaciones químicas 2'-O-metil, 2'-fluoro o 2'-deoxi impide la estimulación inmune mientras que retiene la actividad silenciadora de la molécula [115-118]. Estas modificaciones están presentes en el RNA eucariota y, por tanto, parece razonable que su reconocimiento por parte del sistema inmune sea menor.

Por todos estos motivos, nuestro dúplex de siTNF78 con la doble modificación 2'-O-Me y propandiol permitió una mayor eficiencia silenciadora, probablemente por las propiedades estabilizadoras de las modificaciones, a la vez que garantizó la ausencia de

inmunoestimulación inespecífica *in vitro* e *in vivo*. La adición del propandiol (en el siTNF78) ha mejorado las propiedades del siTNF-OMe en términos de mayor potencia, especificidad, eficacia y seguridad. De esta forma el siTNF78 parece un buen candidato de cara a una aplicación clínica [113]. La administración local de esta molécula directamente en la mucosa colónica constituye una vía alternativa de administración con potencial terapéutico para la IBD.

7.- Necesidad de una terapia local combinada para la IBD

Un aspecto controvertido es el paralelismo de los resultados beneficiosos obtenidos con la inhibición del TNF α y otros mediadores inflamatorios (como el IFN- γ , la IL-12, etc.) en modelos animales, con la eficacia terapéutica frente a la IBD y la repercusión global que tiene interferir en la acción o la expresión de un mediador en particular [86, 97, 119, 120]. Por tanto, cuando intervenimos frente un determinado mediador, *¿estamos verdaderamente actuando contra una única molécula o en realidad estamos induciendo una inhibición o un efecto mucho más amplio?*

Los linfocitos T son células diana de los Ad del grupo C [121] y han sido asociadas con elevadas producciones de IL-10 tras estimulación repetida *in vivo* en el intestino [2] y a nivel sistémico [122]. Los linfocitos T intraintestinales, al representar la mayor población de células T del organismo (más que la esplénica o la de linfonodos), han sido considerados la fuente principal de esta IL-10. Esto sugiere que los efectos de la IL-10 pueden ser más beneficiosos localmente en el lugar de inflamación que a nivel sistémico; por consiguiente la aplicación de terapias a nivel de la mucosa puede comportar un mayor éxito.

En su estudio, *Tilg y col.* [25] demuestran que en pacientes no respondedores al tratamiento con IL-10rhu, el aumento de esta citocina incrementaba los niveles de IFN- γ , limitando así los efectos anti-inflamatorios beneficiosos de la IL-10, y confirmando una vez más la dualidad (inmunosupresora / inmunoestimuladora) de esta molécula, también en humanos [123]. De todas maneras, se desconoce cuál es el efecto predominante de la IL-10 en una enfermedad crónica como la IBD en cuanto a la producción de IFN- γ , si la inmunoestimulación o la inmunosupresión.

La IL-10 también afecta a la producción de TNF α por parte de monocitos y linfocitos, pero también al IFN- γ liberado exclusivamente por linfocitos y células *Natural Killer* (NK). Este puede ser un motivo de la divergencia observada en el tratamiento con IL-10 en EC [25]: las altas dosis de IL-10rhu disminuían la producción de TNF α inducida por LPS pero promovían el aumento de IFN- γ por linfocitos periféricos en la EC activa y en la EC moderada, mientras que dosis más bajas de IL-10 eran más efectivas en EC moderada y no inducían aumento de IFN- γ [25]. Esto sugiere que la administración local -y no sistémica- de la IL-10 podría resultar más beneficiosa.

Se ha demostrado que el TNF α promueve el *clearance* de Ad *in vivo* y parece estar implicado en la magnitud de la respuesta inmune humoral anti-Ad [124-127]. El bloqueo de esta citocina fue capaz de incrementar y prolongar los niveles de expresión transgénica tras la administración intravenosa o intranasal de un Ad5 replicación-defectivo en hígado y pulmón [125, 127], a la vez que consiguió disminuir su toxicidad. En vista de que el 90% del vector adenoviral administrado es eliminado por los macrófagos [128] y que el TNF α es la citocina pro-inflamatoria de secreción predominante en este tipo celular, podría deducirse que el TNF α sería el factor más determinante en las respuestas inflamatorias tempranas contra el Ad [127]. Estos estudios también demostraron que los animales deficientes en la citocina TNF α tenían un menor infiltrado hepático y pulmonar de células mononucleares después de la administración de los Ad.

Por todo ello, en un modelo murino de colitis (DSS) en el que los niveles de la citocina proinflamatoria TNF α se encuentran elevados, el éxito de la terapia adenoviral puede verse limitado por el *clearance* temprano del vector. Por el contrario, en el estudio de *Minter et al.* [126] la IL-10 (humana) demostró aumentar la expresión del transgén, ser no inmunogénica (pese a ser heteróloga) y disminuir el título de anticuerpos, tanto anti-Ad como anti-transgén, comparado con un Ad β -gal, al menos en pulmón.

Esto es también interesante al recordar que la mayoría de vectores adenovirales empleados son deficientes al menos en la región E1, y por tanto les han sido eliminadas o deshabilitadas las proteínas virales que bloquean las funciones del TNF α (*i.e.*, E1B, E3) [129-131] siendo así susceptibles de experimentar *clearance* mediado por esta citocina.

En este apartado hemos tratado de integrar todos los resultados y conclusiones obtenidos en los diferentes estudios de esta tesis doctoral para analizarlos en conjunto con el objetivo de alcanzar una visión global y estructurada.

Parece evidente, por todos estos motivos, que el empleo de un Ad defectivo codificante a la vez de la proteína inmunoreguladora IL-10 y de un siRNA anti-TNF α podría resultar más beneficioso para el tratamiento de la IBD que el empleo aislado de cada terapia, como resultado de una sinergia entre los efectos de IL-10 y la reducción de la expresión de TNF α . Esta **terapia combinada**, empleando un Ad como vector permitiría: *en primer lugar*, obtener una mayor duración de la transducción [124-127] y de los efectos beneficiosos; *en segundo lugar*, la IL-10 promovería con sus acciones anti-inflamatorias la mejoría clínica (*capítulo 1*) a la vez que facilitaría las readministraciones del vector (*capítulo 2*). Además, ya que ha demostrado potentes efectos supresores en la activación y proliferación de las células T y B (*capítulo 2*), resultaría particularmente beneficiosa en una patología con una clara implicación de estas células efectoras [51]. Por su parte, el siRNA anti-TNF α conseguiría silenciar la producción local de la molécula proinflamatoria (*capítulo 4*) a la vez que permitiría inhibir el *clearance* temprano del vector [124-127], permitiendo así una duración mayor de la transducción.

Finalmente, si se utilizase como vector un Ad quimérico como el Ad5/40S del que hemos demostrado un tropismo entérico específico (*capítulo 3*), que contenga en su genoma tanto el gen terapéutico IL-10 como el siRNA anti-TNF α , a la sinergia de ambos transgenes se añadiría la posibilidad de actuar de forma local en el colon inflamado ya que, como se ha demostrado, la disrupción del epitelio favorece la transducción (*capítulo 3*). A la vez, esto podría soslayar tanto los efectos adversos encontrados tras la administración sistémica del Ad5IL-10 en un ambiente inflamatorio (*capítulo 1*) como posiblemente disminuir las respuestas inmunes del huésped contra el vector (*capítulo 2*).

Así pues, los datos obtenidos sugieren que esta terapia combinada podría aportar un buen número de ventajas para el tratamiento de patologías multifactoriales como la IBD.

En conclusión, el diseño de un vector adenoviral con modificaciones capsídicas, sin tropismo hepático y con la incorporación de una molécula inmunomoduladora y un inhibidor de los niveles del TNF α se perfilan como una buena opción para conseguir una terapia local exclusivamente dirigida al intestino y principalmente al colon. Presumiblemente, conseguiría abolir los efectos indeseables encontrados hasta la fecha con aproximaciones menos ambiciosas. Este vector quimérico permitiría la administración local, por vía entérica, sólo hacia el tejido diana, y la expresión de dos moléculas con demostrados efectos beneficiosos, características que se consideran idóneas en un vector de terapia génica [132]. Asimismo, esta terapia combinada podría ser útil también para el tratamiento de otras enfermedades inmunomediadas de tipo T_H1, como la artritis reumatoide [133]. Actuar exclusivamente contra una citocina proinflamatoria puede resultar insuficiente, obteniéndose mayores ventajas si se reduce la proliferación excesiva de las células efectoras o de memoria [62].

Con los avances de la investigación, cada día se hace más evidente la necesidad de que este tipo de terapias no sólo sean **combinadas**, sino también **individualizadas / personalizadas** [24, 134] para así lograr soslayar muchos de los grandes impedimentos como son la genética del individuo, la flora microbiana y las respuestas del sistema inmune, diferentes en cada paciente.

REFERENCIAS

1. Bouguen G, Chevaux JB, Peyrin-Biroulet L. Recent advances in cytokines: Therapeutic implications for inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2011;17:547-56.
2. Kamanaka M, Kim ST, Wan YY, et al. Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin tiger mouse. *Immunity* 2006;25:941-52.
3. Roda G, Sartini A, Zamboni E, et al. Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2010;16:4264-71.
4. Prieto J, Herraiz M, Sangro B, et al. The promise of gene therapy in gastrointestinal and liver diseases. *Gut* 2003;52 Suppl 2:ii49-ii54.
5. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75:263-74.
6. Lindsay JO, Ciesielski CJ, Scheinin T, Brennan FM, Hodgson HJ. Local delivery of adenoviral vectors encoding murine interleukin 10 induces colonic interleukin 10 production and is therapeutic for murine colitis. *Gut* 2003;52:981-7.
7. Spencer SD, Di MF, Hooley J, et al. The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the interleukin-10 receptor2. *J Exp Med* 1998;187:571-8.
8. Lindsay JO, Ciesielski CJ, Scheinin T, Hodgson HJ, Brennan FM. The prevention and treatment of murine colitis using gene therapy with adenoviral vectors encoding IL-10. *J Immunol* 2001;166:7625-33.
9. Lindsay JO, Sandison A, Cohen P, Brennan FM, Hodgson HJ. IL-10 gene therapy is therapeutic for dextran sodium sulfate-induced murine colitis. *Dig Dis Sci* 2004;49:1327-34.
10. Barbara G, Xing Z, Hogaboam CM, Gaudie J, Collins SM. Interleukin 10 gene transfer prevents experimental colitis in rats. *Gut* 2000;46:344-9.
11. Berg DJ, Davidson N, Kuhn R, et al. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J Clin Invest* 1996;98:1010-20.
12. Herfarth H, Scholmerich J. IL-10 therapy in Crohn's disease: at the crossroads. Treatment of Crohn's disease with the anti-inflammatory cytokine interleukin 10. *Gut* 2002;50:146-7.
13. Lindsay J, Van MC, Brennan F, et al. IL-10 gene therapy prevents TNBS-induced colitis. *Gene Ther* 2002;9:1715-21.
14. Sasaki M, Mathis JM, Jennings MH, et al. Reversal of experimental colitis disease activity in mice following administration of an adenoviral IL-10 vector. *J Inflamm (Lond)* 2005;2:13.
15. Tomoyose M, Mitsuyama K, Ishida H, Toyonaga A, Tanikawa K. Role of interleukin-10 in a murine model of dextran sulfate sodium-induced colitis. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:435-40.
16. Whalen JD, Lechman EL, Carlos CA, et al. Adenoviral transfer of the viral IL-10 gene periarticularly to mouse paws suppresses development of collagen-induced arthritis in both injected and uninjected paws. *J Immunol* 1999;162:3625-32.
17. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Menon S, Caddle LB, Coffman RL. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity* 1994;1:553-62.
18. Steidler L, Hans W, Schotte L, et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000;289:1352-5.
19. Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev* 2003;55:241-69.
20. Schreiber S, Heinig T, Thiele HG, Raedler A. Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995;108:1434-44.
21. Colombel JF, Rutgeerts P, Malchow H, et al. Interleukin 10 (Tenovil) in the prevention of postoperative recurrence of Crohn's disease. *Gut* 2001;49:42-6.
22. Fedorak RN, Gangl A, Elson CO, et al. Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease. The Interleukin 10 Inflammatory Bowel Disease Cooperative

- Study Group. *Gastroenterology* 2000; 119:1473-82.
23. Schreiber S, Fedorak RN, Nielsen OH, et al. Safety and efficacy of recombinant human interleukin 10 in chronic active Crohn's disease. Crohn's Disease IL-10 Cooperative Study Group. *Gastroenterology* 2000;119:1461-72.
 24. Mizoguchi A, Mizoguchi E. Animal models of IBD: linkage to human disease. *Curr Opin Pharmacol* 2010;10:578-87.
 25. Tilg H, Van MC, van den EA, et al. Treatment of Crohn's disease with recombinant human interleukin 10 induces the proinflammatory cytokine interferon gamma. *Gut* 2002; 50:191-5.
 26. Hartman ZC, Appledorn DM, Amalfitano A. Adenovirus vector induced innate immune responses: impact upon efficacy and toxicity in gene therapy and vaccine applications. *Virus Res* 2008;132:1-14.
 27. Liu Q, Muruve DA. Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors. *Gene Ther* 2003;10:935-40.
 28. Seregin SS, Appledorn DM, McBride AJ, et al. Transient pretreatment with glucocorticoid ablates innate toxicity of systemically delivered adenoviral vectors without reducing efficacy. *Mol Ther* 2009;17:685-96.
 29. Flaherty DM, Hinde SL, Monick MM, et al. Adenovirus vectors activate survival pathways in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:L393-L401.
 30. Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990;247:1465-8.
 31. Hickman MA, Malone RW, Lehmann-Bruinsma K, et al. Gene expression following direct injection of DNA into liver. *Hum Gene Ther* 1994;5:1477-83.
 32. Meyer KB, Thompson MM, Levy MY, Barron LG, Szoka FC, Jr. Intratracheal gene delivery to the mouse airway: characterization of plasmid DNA expression and pharmacokinetics. *Gene Ther* 1995;2:450-60.
 33. Zhang G, Vargo D, Budker V, Armstrong N, Knechtle S, Wolff JA. Expression of naked plasmid DNA injected into the afferent and efferent vessels of rodent and dog livers. *Hum Gene Ther* 1997;8:1763-72.
 34. Choate KA, Khavari PA. Direct cutaneous gene delivery in a human genetic skin disease. *Hum Gene Ther* 1997;8:1659-65.
 35. Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* 1999;6:1258-66.
 36. Yew NS, Przybylska M, Ziegler RJ, Liu D, Cheng SH. High and sustained transgene expression in vivo from plasmid vectors containing a hybrid ubiquitin promoter. *Mol Ther* 2001;4:75-82.
 37. Yew NS, Zhao H, Przybylska M, et al. CpG-depleted plasmid DNA vectors with enhanced safety and long-term gene expression in vivo. *Mol Ther* 2002;5:731-8.
 38. Hong IC, Mullen PM, Precht AF, et al. Non-viral human IL-10 gene expression reduces acute rejection in heterotopic auxiliary liver transplantation in rats. *Microsurgery* 2003;23:432-6.
 39. Hodges BL, Taylor KM, Joseph MF, Bourgeois SA, Scheule RK. Long-term transgene expression from plasmid DNA gene therapy vectors is negatively affected by CpG dinucleotides. *Mol Ther* 2004;10:269-78.
 40. Higuchi N, Maruyama H, Kuroda T, et al. Hydrodynamics-based delivery of the viral interleukin-10 gene suppresses experimental crescentic glomerulonephritis in Wistar-Kyoto rats. *Gene Ther* 2003;10:1297-310.
 41. Sondergaard M, gnaes-Hansen F, Flyvbjerg A, Jensen TG. Normalization of growth in hypophysectomized mice using hydrodynamic transfer of the human growth hormone gene. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:E427-E432.
 42. Hodges BL, Scheule RK. Hydrodynamic delivery of DNA. *Expert Opin Biol Ther* 2003;3:911-8.
 43. Melgar S, Karlsson A, Michaelsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G1328-G1338.
 44. Sakurai H, Sakurai F, Kawabata K, et al. Comparison of gene expression efficiency and innate immune response induced by Ad vector and lipoplex. *J Control Release* 2007;117:430-7.

45. Muruve DA. The innate immune response to adenovirus vectors. *Hum Gene Ther* 2004;15:1157-66.
46. Schaack J. Induction and inhibition of innate inflammatory responses by adenovirus early region proteins. *Viral Immunol* 2005;18:79-88.
47. Schagen FH, Ossevoort M, Toes RE, Hoeben RC. Immune responses against adenoviral vectors and their transgene products: a review of strategies for evasion. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;50:51-70.
48. St George JA. Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors. *Gene Ther* 2003;10:1135-41.
49. Smith TA, Mehaffey MG, Kayda DB, et al. Adenovirus mediated expression of therapeutic plasma levels of human factor IX in mice. *Nat Genet* 1993;5:397-402.
50. Yang Y, Li Q, Ertl HC, Wilson JM. Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *J Virol* 1995;69:2004-15.
51. Maynard CL, Weaver CT. Intestinal effector T cells in health and disease. *Immunity* 2009;31:389-400.
52. Nayak S, Herzog RW. Progress and prospects: immune responses to viral vectors. *Gene Ther* 2010;17:295-304.
53. Mondino A, Jenkins MK. Surface proteins involved in T cell costimulation. *J Leukoc Biol* 1994;55:805-15.
54. Ruthlein J, Ibe M, Burghardt W, Mossner J, Auer IO. Immunoglobulin G (IgG), IgG1, and IgG2 determinations from endoscopic biopsy specimens in control, Crohn's disease, and ulcerative colitis subjects. *Gut* 1992;33:507-12.
55. Monteleone I, Vavassori P, Biancone L, Monteleone G, Pallone F. Immunoregulation in the gut: success and failures in human disease. *Gut* 2002;50 Suppl 3:III60-III64.
56. Minguet S, Dopfer EP, Pollmer C, et al. Enhanced B-cell activation mediated by TLR4 and BCR crosstalk. *Eur J Immunol* 2008;38:2475-87.
57. Asarch A, Barak O, Loo DS, Gottlieb AB. Th17 cells: a new therapeutic target in inflammatory dermatoses. *J Dermatolog Treat* 2008;19:318-26.
58. Asarch A, Barak O, Loo DS, Gottlieb AB. Th17 cells: a new paradigm for cutaneous inflammation. *J Dermatolog Treat* 2008;19:259-66.
59. Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, et al. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 1996;157:1261-70.
60. Larche M. Immunoregulation by targeting T cells in the treatment of allergy and asthma. *Curr Opin Immunol* 2006;18:745-50.
61. Hanauer SB. Medical therapy for ulcerative colitis 2004. *Gastroenterology* 2004;126:1582-92.
62. Ikenoue Y, Tagami T, Murata M. Development and validation of a novel IL-10 deficient cell transfer model for colitis. *Int Immunopharmacol* 2005;5:993-1006.
63. Arnberg N. Adenovirus receptors: implications for tropism, treatment and targeting. *Rev Med Virol* 2009;19:165-78.
64. Sharma A, Li X, Bangari DS, Mittal SK. Adenovirus receptors and their implications in gene delivery. *Virus Res* 2009;143:184-94.
65. Wirtz S, Galle PR, Neurath MF. Efficient gene delivery to the inflamed colon by local administration of recombinant adenoviruses with normal or modified fibre structure. *Gut* 1999;44:800-7.
66. Nakamura T, Sato K, Hamada H. Reduction of natural adenovirus tropism to the liver by both ablation of fiber-coxsackievirus and adenovirus receptor interaction and use of replaceable short fiber. *J Virol* 2003;77:2512-21.
67. Romero C., Rodriguez E., Burgueño J.F., et al. Biosafety and biodistribution of chimeric adenoviruses to the gastrointestinal tract: a new approach to selective gene delivery to the intestine. *JCC Journal of Crohn's and colitis* 2007;1.
68. Rodriguez E., Romero C., Ferrer M., et al. Therapeutic potential of the chimeric Adenovirus 5/40 as Vector for intestine-directed gene therapy. *Mol Ther* 2006;13.
69. David A, Coupel-Claude H, Chetritt J, et al. Anti-adenovirus immune responses in rats are

- enhanced by interleukin 4 but not interleukin 10 produced by recombinant adenovirus. *Hum Gene Ther* 1998;9:1755-68.
70. Ilan Y, Prakash R, Davidson A, et al. Oral tolerization to adenoviral antigens permits long-term gene expression using recombinant adenoviral vectors. *J Clin Invest* 1997;99:1098-106.
 71. Yang Y, Ertl HC, Wilson JM. MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses. *Immunity* 1994;1:433-42.
 72. Walter E, Croyle MA, Roessler BJ, Amidon GL. The absence of accessible vitronectin receptors in differentiated tissue hinders adenoviral-mediated gene transfer to the intestinal epithelium in vitro. *Pharm Res* 1997;14:1216-22.
 73. Croyle MA, Stone M, Amidon GL, Roessler BJ. In vitro and in vivo assessment of adenovirus 41 as a vector for gene delivery to the intestine. *Gene Ther* 1998;5:645-54.
 74. Le MF, Bost F, Peoc'h M, Roux JJ, Pasquier D, Pasquier B. Carcinoid tumour complicating inflammatory bowel disease. A study of two cases with review of the literature. *Pathol Res Pract* 1994;190:1185-92.
 75. O'Hara JR, Sharkey KA. Proliferative capacity of enterochromaffin cells in guinea-pigs with experimental ileitis. *Cell Tissue Res* 2007;329:433-41.
 76. Watanabe T, Kubota Y, Sawada T, Muto T. Distribution and quantification of somatostatin in inflammatory disease. *Dis Colon Rectum* 1992;35:488-94.
 77. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003;3:521-33.
 78. Papadakis KA, Targan SR. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med* 2000;51:289-98.
 79. Plevy SE, Landers CJ, Prehn J, et al. A role for TNF-alpha and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. *J Immunol* 1997;159:6276-82.
 80. van Deventer SJ. Tumour necrosis factor and Crohn's disease. *Gut* 1997;40:443-8.
 81. Boismenu R, Chen Y, Chou K, El-Sheikh A, Buelow R. Orally administered RDP58 reduces the severity of dextran sodium sulphate induced colitis. *Ann Rheum Dis* 2002;61 Suppl 2:ii19-ii24.
 82. Hartmann G, Bidlingmaier C, Siegmund B, et al. Specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram mitigates experimental colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;292:22-30.
 83. Myers KJ, Murthy S, Flanigan A, et al. Antisense oligonucleotide blockade of tumor necrosis factor-alpha in two murine models of colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304:411-24.
 84. Neurath MF, Fuss I, Pasparakis M, et al. Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. *Eur J Immunol* 1997;27:1743-50.
 85. Popivanova BK, Kitamura K, Wu Y, et al. Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J Clin Invest* 2008;118:560-70.
 86. Scheinin T, Butler DM, Salway F, Scallon B, Feldmann M. Validation of the interleukin-10 knockout mouse model of colitis: antitumor necrosis factor-antibodies suppress the progression of colitis. *Clin Exp Immunol* 2003;133:38-43.
 87. Videla S, Garcia-Lafuente A, Antolin M, et al. Antitumor necrosis factor therapy in rat chronic granulomatous colitis: critical dose-timing effects on outcome. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;287:854-9.
 88. Baert FJ, Rutgeerts PR. Anti-TNF strategies in Crohn's disease: mechanisms, clinical effects, indications. *Int J Colorectal Dis* 1999;14:47-51.
 89. Clark IA. How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007;18:335-43.
 90. Feldmann M, Brennan FM, Foxwell BM, Taylor PC, Williams RO, Maini RN. Anti-TNF therapy: where have we got to in 2005? *J Autoimmun* 2005;25 Suppl:26-8.
 91. Hochberg MC, Lebowitz MG, Plevy SE, Hobbs KF, Yocum DE. The benefit/risk profile of TNF-blocking agents: findings of a consensus panel. *Semin Arthritis Rheum* 2005;34:819-36.
 92. Keane J, Gershon S, Wise RP, et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med* 2001;345:1098-104.
 93. Kirman I, Whelan RL, Nielsen OH. Infliximab: mechanism of action beyond TNF-alpha

- neutralization in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:639-41.
94. Papadakis KA, Targan SR. Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors. *Gastroenterology* 2000;119:1148-57.
95. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005;353:2462-76.
96. Sandborn WJ, Hanauer SB. Antitumor necrosis factor therapy for inflammatory bowel disease: a review of agents, pharmacology, clinical results, and safety. *Inflamm Bowel Dis* 1999;5:119-33.
97. Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R, et al. Adalimumab induction therapy for Crohn disease previously treated with infliximab: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2007;146:829-38.
98. Sandborn WJ. Clinical perspectives in Crohn's disease. Moving forward with anti-TNF-alpha therapy: current needs and future treatments. *Rev Gastroenterol Disord* 2007;7 Suppl 2:S23-S35.
99. Sioud M. Therapeutic siRNAs. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:22-8.
100. Sioud M, Haoudi A. RNA interference. *J Biomed Biotechnol* 2006;2006:89018.
101. Yamada T. Serum amyloid A (SAA): a concise review of biology, assay methods and clinical usefulness. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:381-8.
102. Zhang Y, Cristofaro P, Silbermann R, et al. Engineering mucosal RNA interference in vivo. *Mol Ther* 2006;14:336-42.
103. Ersoy E, Kus CN, Sener U, Coker I, Zorlu Y. The effects of interferon-beta on interleukin-10 in multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol* 2005;12:208-11.
104. Cekaite L, Furset G, Hovig E, Sioud M. Gene expression analysis in blood cells in response to unmodified and 2'-modified siRNAs reveals TLR-dependent and independent effects. *J Mol Biol* 2007;365:90-108.
105. Judge AD, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintock K, MacLachlan I. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* 2005;23:457-62.
106. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 2002;296:298-300.
107. Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 2003;5:834-9.
108. Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 2003;34:263-4.
109. Kariko K, Bhuyan P, Capodici J, Weissman D. Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3. *J Immunol* 2004;172:6545-9.
110. Sioud M, Sorensen DR. Cationic liposome-mediated delivery of siRNAs in adult mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;312:1220-5.
111. Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 2002;26:199-213.
112. Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, et al. Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 2005;11:263-70.
113. Sioud M. Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization. *J Mol Biol* 2005;348:1079-90.
114. Heidel JD, Hu S, Liu XF, Triche TJ, Davis ME. Lack of interferon response in animals to naked siRNAs. *Nat Biotechnol* 2004;22:1579-82.
115. Allerson CR, Sioufi N, Jarres R, et al. Fully 2'-modified oligonucleotide duplexes with improved in vitro potency and stability compared to unmodified small interfering RNA. *J Med Chem* 2005;48:901-4.
116. Judge AD, Bola G, Lee AC, MacLachlan I. Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. *Mol Ther* 2006;13:494-505.
117. Sioud M. RNA interference and innate immunity. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:153-63.
118. Sioud M, Furset G, Cekaite L. Suppression of immunostimulatory siRNA-driven innate

- immune activation by 2'-modified RNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;361:122-6.
119. Hommes DW, Mikhajlova TL, Stoinov S, et al. Fontolizumab, a humanised anti-interferon gamma antibody, demonstrates safety and clinical activity in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Gut* 2006;55:1131-7.
 120. Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, et al. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 2004;351:2069-79.
 121. Garnett CT, Erdman D, Xu W, Gooding LR. Prevalence and quantitation of species C adenovirus DNA in human mucosal lymphocytes. *J Virol* 2002;76:10608-16.
 122. Sundstedt A, Hoiden I, Rosendahl A, Kalland T, Van RN, Dohlsten M. Immunoregulatory role of IL-10 during superantigen-induced hyporesponsiveness in vivo. *J Immunol* 1997;158:180-6.
 123. Lauw FN, Pajkrt D, Hack CE, Kurimoto M, van Deventer SJ, Van der PT. Proinflammatory effects of IL-10 during human endotoxemia. *J Immunol* 2000;165:2783-9.
 124. Benihoud K, Saggio I, Opolon P, et al. Efficient, repeated adenovirus-mediated gene transfer in mice lacking both tumor necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha. *J Virol* 1998;72:9514-25.
 125. Elkon KB, Liu CC, Gall JG, et al. Tumor necrosis factor alpha plays a central role in immune-mediated clearance of adenoviral vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9814-9.
 126. Minter RM, Rectenwald JE, Fukuzuka K, et al. TNF-alpha receptor signaling and IL-10 gene therapy regulate the innate and humoral immune responses to recombinant adenovirus in the lung. *J Immunol* 2000;164:443-51.
 127. Zhang HG, Zhou T, Yang P, Edwards CK, III, Curiel DT, Mountz JD. Inhibition of tumor necrosis factor alpha decreases inflammation and prolongs adenovirus gene expression in lung and liver. *Hum Gene Ther* 1998;9:1875-84.
 128. Worgall S, Wolff G, Falck-Pedersen E, Crystal RG. Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration. *Hum Gene Ther* 1997;8:37-44.
 129. Krajcsi P, Dimitrov T, Hermiston TW, et al. The adenovirus E3-14.7K protein and the E3-10.4K/14.5K complex of proteins, which independently inhibit tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis, also independently inhibit TNF-induced release of arachidonic acid. *J Virol* 1996;70:4904-13.
 130. Stewart AR, Tollefson AE, Krajcsi P, Yei SP, Wold WS. The adenovirus E3 10.4K and 14.5K proteins, which function to prevent cytolysis by tumor necrosis factor and to down-regulate the epidermal growth factor receptor, are localized in the plasma membrane. *J Virol* 1995;69:172-81.
 131. Wold WS, Hermiston TW, Tollefson AE. Adenovirus proteins that subvert host defenses. *Trends Microbiol* 1994;2:437-43.
 132. Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 2001;7:33-40.
 133. Maini RN, Taylor PC. Anti-cytokine therapy for rheumatoid arthritis. *Annu Rev Med* 2000;51:207-29.
 134. Shih DQ, Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14:390-400.



Conclusiones

Conclusiones generales

1) La administración sistémica de vectores de expresión de IL-10 puede suponer una estrategia terapéutica valiosa para la inflamación intestinal. La generación de plásmidos codificantes de dicha citocina inmunomoduladora y carentes de motivos inmunoestimuladores Citosina-poli-Guanina ofrece importantes ventajas en comparación con el uso de Ad5 defectivos de primera generación por vía intravenosa. Los efectos clínicos beneficiosos de ambos tratamientos son similares a corto plazo, si bien, a medio plazo, el empleo de Ad5IL-10 en una situación inflamatoria genera una elevada toxicidad que limitaría su aplicación. En cambio, la sobreexpresión de IL-10 como resultado de la transfección hepática mediante plásmidos CpG-free resulta segura y eficaz para paliar la colitis murina inducida por dextrasulfonato sódico.

2) En animales sanos, la administración reiterada de Ad5IL-10 parece ocasionar efectos inmunomoduladores que sugieren que una administración múltiple podría ser bien tolerada. La expresión del transgén IL-10 es capaz de disminuir las respuestas inmunes humorales y celulares específicas y de modular el fenotipo T_H1 (tanto a nivel de las citocinas proinflamatorias TNF α e IFN- γ como de IgG_{2a}) y generar un predominio T_H2 relativo (con aumento de IL-10, IL-4 e IgG₁). Estos efectos son tanto más marcados cuanto mayor es el número de inyecciones del vector Ad5IL-10. La supresión de las respuestas T_H1, así como la inhibición de la proliferación de linfocitos T y B, sugieren que la administración reiterada del Ad5IL-10 podría ejercer efectos beneficiosos en patologías crónicas en las que, como ocurre en la IBD, existe una implicación directa de células T efectoras y/o células B.

3) Ninguno de los adenovirus quiméricos ensayados (Ad40S, Ad40SL, Ad5.40 y Ad40.5) ocasiona signos clínicos ni histopatológicos sugestivos de toxicidad. La introducción de la proteína *fiber* corta del Ad40 para la generación de adenovirus quiméricos 5/40 reduce el tropismo natural del Ad5 hacia el hígado, potenciando su biodistribución hacia el colon. Además, la capacidad del Ad5/40S de transducir células enteroendocrinas, de recambio más lento que las IEC's, sugiere que la expresión, y por tanto los efectos del transgén, pudieran ser más sostenidos que los de vectores que sólo consigan transducir células epiteliales. En animales colícticos, la erosión de la mucosa del intestino grueso puede favorecer la transducción, no sólo de las células epiteliales y enteroendocrinas sino probablemente de los macrófagos de la mucosa, si bien no hemos logrado la cuantificación precisa del grado de transducción. Por estos motivos, el adenovirus quimérico 5/40S resulta un vector de terapia génica con un perfil de biodistribución adecuado para las enfermedades intestinales, ya que logra una

transducción gastrointestinal (sobre todo colónica) prácticamente exclusiva tras su administración local (intrarectal).

4) La administración intrarectal de cadenas dúplex de siRNA químicamente modificados mediante grupos 2'-O-metil y propandiol (siTNF78) produce un marcado efecto terapéutico en el modelo murino de colitis por DSS al 5%. Este efecto se correlaciona con la disminución temprana en los niveles locales de mRNA de TNF α . Estas modificaciones químicas comportan también la eliminación de los efectos *off-target* mediados por la estimulación de receptores *toll-like*. El análisis de la expresión génica diferencial sobre micromatrices ha permitido confirmar a nivel molecular los resultados obtenidos en la evaluación clínica, histopatológica y bioquímica sobre el modelo murino. El siTNF78 regula a la baja diversos genes proinflamatorios y la expresión de receptores *toll-like*, y normaliza la expresión de los genes relacionados con la integridad de la mucosa colónica hasta valores comparables a los que presentan los animales control sanos. Estos resultados sugieren que la silenciación génica mediante siRNA's con determinadas modificaciones químicas puede ofrecer alternativas válidas para el diseño de nuevas terapias locales dirigidas al tratamiento de enfermedades inflamatorias como la IBD.

Estos resultados sugieren, en conjunto, que el uso de terapias combinadas podría aportar importantes ventajas. Así, para el tratamiento de una enfermedad compleja y multifactorial como es la IBD, el empleo de un adenovirus defectivo que permita sobreexpresar el gen inmunomodulador IL-10 y un siRNA anti-TNF α podría resultar más beneficioso, que el empleo de cada una de estas terapias separadamente. Además, con un vector adenoviral quimérico como el Ad5/40S, con tropismo específico por el tejido diana, podrían evitarse los riesgos asociados a la administración por vía sistémica.



Anexos

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

TABLA 1: Características diferenciales entre Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa	pág. 4
TABLA 2: Toll-like receptors	pág. 11
TABLA 3: Patrón de citocinas en IBD	pág. 15
TABLA 4: Modelos de colitis inducida químicamente en roedores	pág. 24
TABLA 5: Modelos de colitis inducida genéticamente en roedores	pág. 27
TABLA 6: Modelos de colitis espontánea en roedores	pág. 27
TABLA 7: Modelos de transferencia celular en roedores	pág. 27
TABLA 8: Clasificación de los adenovirus humanos	pág. 31
TABLA 9: Ventajas y desventajas de la RNAi	pág. 48

CAPÍTULO 1

TABLE 1: Groups and number of animals employed, treatment, route of administration and dose used in short- and mid-term follow-up.....	pág. 74
TABLE 2: Schedule of short- (7 days) and mid-term (15 days) follow-ups. Administration of treatments, days of exposure to DSS, endpoints and percent mortality are stated in the table.....	pág. 74
TABLE 3: Parameters and scores related with the DAI and endpoint criteria calculation. (Morton DB and Griffiths PH, Vet Rec. 1985;116(16):431-436)	pág. 74
TABLE 4: Plasma mIL-10 and mSAA levels at endpoints (7 and 15 days)	pág. 86
TABLE 5: Global results of short- and mid-term follow-up studies with Ad5IL-10 and Pl/IL-10 in the DSS murine model of colitis	pág. 88

CAPÍTULO 2

TABLE 1: Groups and number of animals employed, treatment and dose used. Numbers indicate the amount of animals employed for <i>in vitro</i> studies.....	pág. 98
TABLE 2: Anti-Ad5NAb titers. Numbers indicate the reciprocal (1/x) dilution that gave a 50% infection capacity in each group	pág. 105
TABLE 3: Splenocyte cytokine and immunoglobulin releasing capacities. Highest levels for each cytokine/immunoglobuline are highlighted in yellow	pág. 115

CAPÍTULO 3

TABLE 1: Number of healthy animals receiving different Ad for each route of administration...	pág. 130
TABLE 2: Number of healthy or colitic animals receiving each of the Ad or saline by the intrarectal route.....	pág. 130
TABLE 3: Parameters and scores related with the DAI and endpoint criteria calculation. (Morton DB and Griffiths PH, Vet Rec. 1985;116(16):431-436)	pág. 132
TABLE 4: Primary and secondary antibodies employed in the immunohistochemical and immunofluorescence studies in healthy and colitic mice.....	pág. 133

TABLE 5: Group of samples analyzed in the microbiological / luminometric studies. pág. 135

CAPÍTULO 4

TABLE 1: Parameters and scores related with the DAI and the endpoint criteria calculation. (Morton DB and Griffiths PH, Vet Rec. 1985;116(16):431-436) pág. 160

TABLE 2: Groups and number of animals employed, corresponding treatment and dose used at the different endpoints..... pág. 162

TABLE 3: Mean (\pm SEM) TNF α mRNA values at days 3, 5 and 8 in distal colon of colitic mice..... pág. 174

TABLE 4: Results of day 5 and day 8 follow-up studies. pág. 177

TABLE 5: Gene Ontology pathways enriched upon treatment with siScr-OME or siTNF78..... pág. 180

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

FIGURA 1: Barrera inmune innata intestinal y mecanismos que confinan a la microbiota en el lumen..... pág. 8

FIGURA 2: Inmunidad innata y adaptativa pág. 8

FIGURA 3a: Respuesta inmune mucosa frente a la microbiota en condiciones normales pág. 9

FIGURA 3b: Respuesta inmune mucosa en IBD pág. 9

FIGURA 4: Diferenciación de células T CD4⁺ y perfil citocínico pág. 13

FIGURA 5: La IL-10 es una citocina pleiotrópica pág. 19

FIGURA 6: VÍA DEL TNF α - regulación, efectos y posibles dianas terapéuticas pág. 22

FIGURA 7: Visión esquemática de un adenovirus pág. 31

FIGURA 8: Activación del sistema inmune del huésped tras la administración adenoviral pág. 35

FIGURA 9A: Recorrido del pDNA tras la administración hidrodinámica y su llegada hasta el hígado..... pág. 40

FIGURA 9B: Tras la endocitosis el pDNA ha de ser liberado del endosoma para ejercer su función..... pág. 40

FIGURA 10A: RNAi provocada por largas cadenas de dsRNA en no mamíferos pág. 46

FIGURA 10B: RNAi provocada por siRNA's en mamíferos..... pág. 46

FIGURA 10C: En mamíferos, la RNAi puede ser también provocada por vectores de expresión de siRNA's pág. 46

FIGURA 11: Estrategias de administración de siRNA's in vivo pág. 49

CAPÍTULO 1

FIGURE A: EXPERIMENTAL DESIGN. Colitis was induced in C57BL/6 female mice by addition of 3% DSS in the tap water (ad libitum). Several IL-10 expressing or null vectors were i.v. injected 18 hours before induction of colitis..... pág. 75

FIGURE 1: DSS COLITIS IN FEMALE AND MALE C57BL/6. C57BL/6 female and male mice received 3% DSS for five consecutive days. Mice were euthanized 7, 15 or 27 days later..... pág. 78

- FIGURE 2: SHORT-TERM FOLLOW-UP STUDY.** C57BL/6 female mice received an intravenous injection of either Ad5IL-10 or Pl/IL-10 18 hours prior to the induction of 3% DSS colitis. Mice were euthanized 7 days later *pág.* 79
- FIGURE 3: HISTOLOGIC ANALYSIS** of C57BL/6 healthy control animals (CONTROL), colitic control (3% DSS), colitic treated with Ad5IL-10 (DSS+Ad5IL-10), colitic treated with Pl/IL-10 (DSS+Pl/IL-10), Ad null and plasmid null (Pl null) treated mice. H&E slides of colon (40x and 100x), liver (100x) and spleen (40x) of each group of animals at endpoint (7 days). *pág.* 81
- FIGURE 4: MID-TERM FOLLOW-UP STUDY.** C57BL/6 female mice received an intravenous injection of Ad5IL-10 or Pl/IL-10 18 hours prior to the induction of 3% DSS colitis. Mice were euthanized 15 days later..... *pág.* 83
- FIGURE 5: H&E LIVER SECTIONS** (200x) of control mice (i.e. healthy -CONTROL- and colitic controls -3% DSS-), plasmid null (Pl null), adenovirus null (Ad null), Pl/IL-10 and Ad5IL-10 treated colitic at 7 (for Ad null and Pl null) and 15 days. *pág.* 84
- FIGURE 6: HISTOLOGIC ANALYSIS** of C57BL/6 healthy control mice (CONTROL), colitic control (3% DSS), colitic treated with Ad5IL-10 (DSS+Ad5IL-10) and colitic treated with Pl/IL-10 (DSS+Pl/IL-10). H&E slides of colon (40x and 100x), liver (100x) and spleen (40x) of each group of animals at endpoint (15 days)..... *pág.* 85
- FIGURE 7: Plasma IL-10 levels** (pg/mL) of mice euthanized at day 7 (A) and at day 15 (B)..... *pág.* 86
- FIGURE 8: Plasma SAA levels** (µg/mL) of mice euthanized at day 7 (A) and at day 15 (B)..... *pág.* 86
- FIGURE 9: CORRELATION ANALYSIS.** Linear regression analysis was performed to study the correlation between different clinical parameters using individual data of C57BL/6 mice of all experimental groups. A) Correlations at day 7. B) Correlations at day 15. *pág.* 87

CAPÍTULO 2

- FIGURE A: EXPERIMENTAL DESIGN.** Healthy CD1 mice were employed for the study of the host immune responses exerted after Ad5 immunization with multiple vector administrations as indicated (two i.p. on days 0 and 30, and the last i.v. on day 45). Mice were euthanized 3 days after the last injection and host humoral and cellular immune responses were studied *in vitro*. *pág.* 98
- FIGURE 1: T and B cell proliferative responses.** CD1 mice received the corresponding treatment protocol. Animals were euthanized three days later and spleens were aseptically removed. T and B cells were stimulated with ConA or LPS, respectively, for two days in the presence or absence of the Ag (Ad5GFP). Proliferation was estimated by [5'-3H] thymidine uptake. Results are expressed in disintegrations per minute (dpm). Mean ± SEM are given for each experimental condition *pág.* 102
- FIGURE 2: Increase in T and B cell proliferation** (Δ dpm). A) Increase in T cell proliferation, Δ dpm (ConA / B). B) Increase in B cell proliferation, Δ dpm (LPS / B). *pág.* 103
- FIGURE 3: Mean splenocyte viability.** Splenocyte viability was measured 48 hours after stimulations using ViViD as the viability marker. Results were read in a BD FACSCanto II instrument (Becton Dickinson)..... *pág.* 103
- FIGURE 4: Ad5 Neutralization Assay.** A549 cells were cultured with serial dilutions of serum corresponding to mice reinfected with Ad5IL-10 or Ad5 encoding a non-immunoregulatory transgene. After Ad5GFP addition (12 PP/well), cytometric analysis (GFP+ cells) allowed to estimate the infection percent. *pág.* 104

FIGURE 5: The humoral immune response to Ad5 infection. *In vitro* neutralization of Ad infection was determined for each serum dilution of mice reinfected with Ad5IL-10 or Ad5 encoding a different transgene *pág.* 105

FIGURE 6: IL-10 levels obtained in splenocytes after ConA stimulation in animals pre-immunized with Ad5. A) IL-10 levels (pg/mL). B) IL-10 levels normalized to T cell proliferation ((pg/mL)/dpm x 10⁻³). Results are expressed as mean ± SEM..... *pág.* 107

FIGURE 7: IL-4 levels obtained in splenocytes after ConA stimulation in animals pre-immunized with Ad5. A) IL-4 levels (pg/mL). B) IL-4 levels normalized to T cell proliferation ((pg/mL)/dpm x 10⁻³). Results are expressed as mean ± SEM. *pág.* 108

FIGURE 8: IFN-γ levels obtained in splenocytes after ConA stimulation in animals pre-immunized with Ad5. A) IFN-γ levels (pg/mL). B) IFN-γ levels normalized to T cell proliferation ((pg/mL)/dpm x 10⁻³). Results are expressed as mean ± SEM. *pág.* 109

FIGURE 9: TNFα levels obtained in splenocytes after ConA stimulation in animals pre-immunized with Ad5. A) TNFα levels (pg/mL). B) TNFα levels normalized to T cell proliferation ((pg/mL)/dpm x 10⁻³). Results are expressed as mean ± SEM. *pág.* 110

FIGURE 10: IFN-γ/IL-10 ratio. Results are expressed as the IFN-γ/IL-10 ratio for each experimental group (mean ± SEM). *pág.* 111

FIGURE 11: IgG₁ levels obtained in splenocytes after LPS stimulation in animals pre-immunized with Ad5. A) IgG₁ levels (ng/mL). B) IgG₁ levels normalized to B cell proliferation ((ng/mL) / dpm x 10⁻³). Results are expressed as mean ± SEM. *pág.* 112

FIGURE 12: IgG_{2a} levels obtained in splenocytes after LPS stimulation in animals pre-immunized with Ad5. A) IgG_{2a} levels (ng/mL). B) IgG_{2a} levels normalized to B cell proliferation ((ng/mL) / dpm x 10⁻³). Results are expressed as mean ± SEM. *pág.* 113

FIGURE 13: IgG_{2a}/IgG₁ ratio. Results are expressed as the IgG_{2a}/IgG₁ (T_H1/T_H2) ratio for each experimental group (mean ± SEM). *pág.* 114

CAPÍTULO 3

FIGURE A: Chimeric Ad 5/40 employed in the biosafety and biodistribution studies..... *pág.* 131

FIGURE 1: Serum aminotransferase levels of animals treated with single doses of the corresponding Ad or saline (SSF) as control, administered by intravenous, oral or intrarectal routes. Figure 1A shows AST levels (U/L) and figure 1B, ALT levels (U/L). *pág.* 137

FIGURE 2: Beta-galactosidase activity (LUMINOMETRY). **1)** β-galactosidase activity found in liver, lung, spleen and muscle after single doses of the corresponding vector by three different routes of administration. **2)** β-galactosidase activity in gastrointestinal tissues by three different routes. Results are expressed as mean ± SEM. *pág.* 138

FIGURE 3: Beta-galactosidase immunohistochemistry in liver and intestine sections of CD1 mice treated with single doses of Ad5β-gal, Ad40Sβ-gal or SSF (negative control). *pág.* 139

FIGURE 4A: Fluorescence micrographs of ileum, colon and liver sections of healthy CD1 mice treated with Ad40SGFP or Ad5GFP (positive control). *pág.* 140

- FIGURE 4B: Representative ileum magnification of a mouse administered with Ad40SGFP p.o.** Cells expressing the GFP reporter gene could be appreciated (white arrows). These cell types share similar morphology ('cat pupil-shaped' cells) with enteroendocrine cells. *pág.* 140
- FIGURE 5A: Chromogranin A immunohistochemical analysis of intestinal sections of CD1 healthy female mice** receiving either Ad40SGFF i.r. and p.o., or Ad5GFP i.r. and p.o. Images show transfected cells within the intestinal tract (*in green*) and co-localization (*in yellow*) of some cells with chromogranin A positive cells (*in red*). *pág.* 141
- FIGURE 5B: Chromogranin A immunohistochemical analysis of intestinal sections of CD1 colitic female mice** receiving either Ad40SGFF i.r. or Ad5GFP i.r. *pág.* 142
- FIGURE 6A: Somatostatin immunohistochemical analysis of intestinal sections of CD1 healthy female mice** receiving either Ad40SGFF i.r. and p.o., or Ad5GFP i.r. and p.o. Images show transfected cells within the intestinal tract (*in green*) and co-localization (*in yellow*) of some cells with somatostatin positive cells (*in red*). *pág.* 143
- FIGURE 6B: Somatostatin immunohistochemical analysis of intestinal sections of CD1 colitic female mice** receiving either saline i.r., Ad40SGFF i.r. or Ad5GFP i.r. *pág.* 144
- FIGURE 7: CD68 immunohistochemical analysis of intestinal sections of CD1 colitic female mice** receiving either Ad40SGFF i.r. or Ad5GFP i.r. Images show transfected cells within the intestinal tract (*in green*) and co-localization (*in yellow*) of some cells with CD68 positive cells (*in red*). *pág.* 145
- FIGURE 8: Intrarectal administration of SSF, Ad5GFP or Ad40SGFP to CD1 colitic female mice.** Administration of 4% DSS during 5 consecutive days ensures the instauration of a moderate colitis in this strain of mice. *pág.* 147
- FIGURE 9: Microbiological counts (CFU/100 μ L) and luminometry (relative luminescent units, RLU) of samples of healthy and colitic mice (4% DSS, 5d).** Graphs show four groups of samples of liver, ileum, caecum and colon sonicated and not sonicated, and diluted in PBS 1X or Lysis Buffer (LB). *pág.* 148
- FIGURE 10: Agar MacCONKEY cultures of tissue homogenates of colitic mice (4% DSS, 5d).....** *pág.* 149

CAPÍTULO 4

- FIGURE A: EXPERIMENTAL DESIGN.** Colitis was induced in C57BL/6 female mice by addition of 5% DSS in the tap water (*ad libitum*). Several siRNA TNF α molecules were administered intrarectally. *A)* siRNA was administered i.r. at day 2. Mice were euthanized 16 hours later (day 3 post-induction of colitis). *B)* siRNA was administered i.r. at days 2 and 4. Mice were euthanized either at day 5 or at day 8 post-induction of colitis. *pág.* 160
- FIGURE 1: In vitro potency of unmodified or modified siRNAs to silence murine TNF α in cell lines and murine peritoneal macrophages.** *pág.* 165
- FIGURE 2: 5% DSS COLITIS IN FEMALE C57BL/6 MICE.** *pág.* 166
- FIGURE 3: THERAPEUTIC RESPONSE AT DAY 5.** 5% DSS was administered to C57BL/6 mice in their drinking water (*ad libitum*). At 48h and 96h animals were treated with siTNF, siTNF-OMe, siTNF78 or siScr-OMe. Animals were subjected to a daily observation during the experimental period to monitor signs of disease. Mice were euthanized at day 5 after the initiation of the experiment. *pág.* 168
- FIGURE 4A: Macroscopic aspect of caeca of healthy controls and colitic mice treated either with siTNF78 or siScr-OMe, and euthanized 5 days post-induction of colitis.....** *pág.* 169

FIGURE 4B: HISTOLOGIC ANALYSIS of C57BL/6 healthy control animals (HEALTHY), colitic treated with unmodified siRNA against TNF α (siTNF), siRNA TNF-OMe (siTNF-OMe) or siRNA TNF78 (siTNF78) and colitic controls treated with siRNA scr-OMe (siScr-OMe). Images show H&E slides of colon samples (200x and 400x) of each group of animals at endpoint (day 5). A) Magnification of the inflammatory infiltrate of siScr-OMe colitic mice.....pág. 170

FIGURE 5: THERAPEUTIC RESPONSE AT DAY 8. 5% DSS was administered to C57BL/6 mice in their drinking water (*ad libitum*). At 48h and 96h animals were treated with siTNF, siTNF-OMe, siTNF78 or siScr-OMe. Animals were subjected to a daily observation during the experimental period to monitor signs of disease. Mice were euthanized at day 8 after the initiation of the experiment.....pág. 172

FIGURE 6: HISTOLOGIC ANALYSIS of C57BL/6 control mice (HEALTHY), colitic treated with unmodified siRNA against TNF α (siTNF), siRNA TNF-OMe (siTNF-OMe), siRNA TNF78 (siTNF78) and colitic controls treated with siRNA scr-OMe (siScr-OMe). Images show H/E slides of colon samples (200x) of each experimental group at endpoint (8 days).pág. 173

FIGURE 7: siRNA TNF α silencing efficiency in the DSS model of colitis. 5% DSS was administered to C57BL/6 mice in their drinking water. **qRT-PCR at day 3:** At 56 h animals were intrarectally treated with siTNF78 or siScr-OMe, and colon was obtained for mRNA extraction 16h later. Subsequently, the amount of TNF α was measured by qRT-PCR.pág. 174

FIGURE 8: Serum TNF α levels (pg/mL) at day 3 (A) and at day 5 (B), analyzed by ELISA. Mice were administered intrarectally once (at day 2 after induction of colitis) or twice (at days 2 and 4) with siRNA TNF α sequences (either modified or not). Sera were obtained at days 3 and 5 post-induction of colitis and TNF α protein levels were measured by ELISA. Results are expressed as mean + SEM.....pág. 175

FIGURE 9: Chemically modified siRNA molecules did not induce immunostimulatory effects in PBMCs. Adherent PBMCs were transfected with various concentrations (10, 20, 50 nM) of different siRNAs. Subsequently, huTNF α was measured in the supernatants by ELISA to assess the immunostimulatory capacity of the siRNA molecules. Data are expressed as mean + SEMpág. 176

FIGURE 10: Chemically modified siRNAs did not induce IFN- α (A) or IFN- β (B) expression in colon extracts of colitic treated mice at day 5. Mice were administered intrarectally at days 2 and 4 after induction of colitis with siRNA TNF α sequences (either modified or not) complexed with cationic lipids. Colon extracts were obtained at day 5 post-induction of colitis and mRNA levels were measured by qRT-PCR. Results are expressed as mean + SEM (relative to healthy controls).pág. 176

FIGURE 11: Correlation analysis. Linear regression analysis was performed to study the correlation between different clinical parameters using individual data of C57BL/6 mice of all experimental groups.

A) Correlations at day 5. B) Correlations at day 8pág. 177

FIGURE 12: Differential gene expression in colitic mice after specific siRNA treatments.

A) General HEATMAP of differentially expressed genes after treatment with various siRNAs. Treatments are grouped by similarities based on their effects on gene expression. B) Venn diagram of significantly up-regulated or down-regulated genes upon treatment. C) Clustering analysis of genes significantly altered by treatment with siTNF78. A total of 60 genes were found to be up-regulated in this experimental group, exclusivelypág. 179

FIGURE 13: Modulation of the TLR-response mediated by siRNAs. (A) Induction of gene expression by siTNF as compared to healthy controls. (B) Changes in gene expression induced by treatment with chemically modified siTNF78 and siTNF-OMe, or with siScr-OMe, as compared to unmodified siTNF. The data represent the mean \pm SEM.pág. 181

ÍNDICE DE REACTIVOS

CAPÍTULO 1

- C57BL/6 healthy female mice (13 weeks old, 18-20 g body weight) purchased from Charles River (Lyon, France).
- CpG-free plasmid (courtesy of Dr. Perales, Bellvitge, Barcelona, Spain) and CpG-free *null* plasmid (Invivogen, Inc.).
- Murine IL-10 cDNA obtained from RIKEN Open reading frame Gene-Bank (Japan).
- BJ5183 cells (Cat. # 200154, Stratagene).
- HEK 293 cells (American Type Culture Collection, ATCC # CRL-1573™).
- Dextran sulphate sodium salt (DSS, MP Biomedicals; MW 36-50 kD, Cat. # 0218055890).
- Isoflurane (Isoba®vet, Shering-Plough).
- Hexadecyltrimethyl ammonium bromide (HTAB, H9151, Sigma).
- *o*-dianisidine dihydrochloride (D3252, Sigma)
- H₂O₂ 30% (Sigma).
- Murine IL-10 ELISA kit (BMS61INST, Bender MedSystems).
- Murine SAA ELISA kit (KMA0011C, Biosource, Invitrogen).

CAPÍTULO 2

- CD1 healthy female mice (8-10 weeks old, 26-28 g body weight) purchased from Charles River (Lyon, France).
- Ad5GFP, Ad5βgal, Ad5IL-10 (courtesy of Dr. Chillón, CBATEG, Barcelona, Spain).
- Isoflurane (Isoba®vet, Shering-Plough).
- Dulbecco's modified Eagle's medium with L-glutamine (DMEM, Cat. # 41965 and Cat. # 31966, Gibco®).
- Lysing Buffer (Cat. # 555899, BD Biosciences).
- Fetal bovine serum (FBS) (PAA, A15-151).
- Penicillin / streptomycin (Cat. # 15070, Gibco®).
- Non-essential aminoacids (NEAs) (Cat. # 11140, Gibco®).
- Trypan blue Solution 0.4% liquid (Cat. # T8154, Sigma).
- Concanavalin A (ConA, C5275, Sigma) (used at 5 µg/mL).
- Lipopolysaccharide (LPS, L-2630, Sigma) (used at 50 µg/mL).
- [5'-³H] Thymidine (TRK328, 37MBq, 1mCi; Amersham) (1 µCi/well).
- Trichloroacetic acid (TCA, Cat. # 141067.1611, Panreac).
- Sodium dodecil sulphate (SDS; Cat. # 24730-020, Invitrogen).
- Sodium hydroxide (NaOH; Cat. # 303126, Panreac).
- ECOLUMETM liquid scintillation fluid (Cat. # 0188247005, MP Biomedicals).
- ELISA kits (Bender Medsystems): TNFα (BMS607/2INST), IFN-γ (BMS606INST), IL-10 (BMS614/2INST), IL-4 (BMS613INST).
- ELISA kits (Kamiya): IgG₁ (KT-403), IgG_{2a} (KT-404).

- A549 human lung carcinoma cells (American Type Culture Collection, ATCC # CCL-185™).
- Violet ViViD viability marker (L34955, Invitrogen).

CAPÍTULO 3

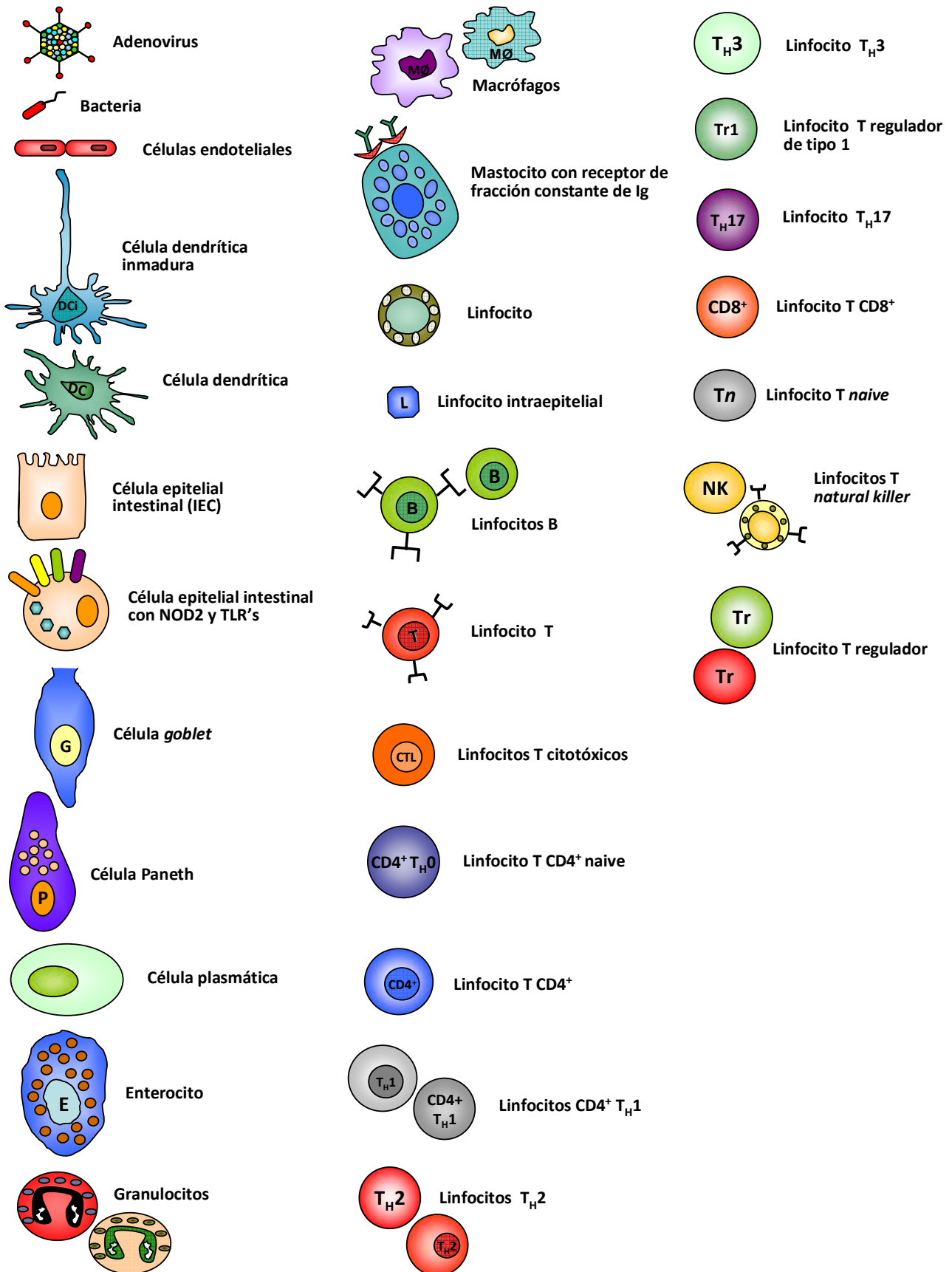
- CD1 healthy female mice (8-10 weeks old, 26-28 g body weight), purchased from Charles River (Lyon, France).
- Dextran sulphate sodium salt (DSS, MP Biomedicals; MW 36-50 kD, Cat. # 0218055890).
- Ketamine (Merial Labs) / Xilazine (Bayer) at a 55/15 mg/kg dose diluted in saline (administration volume 10 mL/kg).
- Recombinant E1-deleted Ad5 β -gal, Ad5GFP under the control of the CMV promoter were provided by Dr. M. Chillón (CBATEG, Barcelona, Spain). The chimeric Ad5/40 (Ad40S, Ad40SL, Ad5.40 and Ad40.5) were generously donated by Dr. H. Hamada (Sapporo Medical University, JAPAN) and amplified by Dr. M. Chillón.
- Isoflurane (Isoba®vet, Shering-Plough).
- Avidin / biotin blocking kit (SP-2001, Vector®).
- Diaminobenzidine (DAB, SK-4100, Vector®).
- Vectastain® ABC ELITE (PK-6100, Vector®).
- Primary rabbit polyclonal antibody to *E. coli* β -galactosidase (ab616-1, Abcam; diluted 1:900).
- Secondary antibody biotinylated goat anti rabbit IgG (sc-2040, lot # K2806, Santa Cruz; diluted 1:200).
- Primary anti-chromogranin A antibody (rabbit anti Chr-A (H-300) polyclonal antibody; sc-13090, lot # E2503, Santa Cruz; diluted: 1:50).
- Primary anti-somatostatin antibody (primary rabbit anti-somatostatin polyclonal antibody; AB5494, lot # 0602021567, Chemicon; diluted 1:150).
- Primary anti-CD68 antibody (rabbit anti CD68 polyclonal antibody; sc-9139, lot # E0907, Santa Cruz; diluted 1:50).
- Secondary antibody (goat anti rabbit IgG conjugated with Texas Red; sc-2780, Santa Cruz; diluted 1:150).
- Galacto-light Plus™ kit, (T101, Tropix).
- Hexadecyltrimethyl ammonium bromide (HTAB, H9151, Sigma).
- *o*-dianisidine dihydrochloride (D3252, Sigma).
- H₂O₂ 30% (Sigma).

CAPÍTULO 4

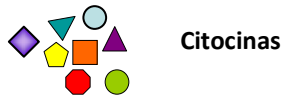
- siRNA TNF α unmodified (*siTNF*): sense strand 5'-GUGCCUAUGUCUCAGCCUC-dT-dT-3' and antisense strand 5'-GAGGCUGAGACAUAGGCAC-dT-dT-3'. (Sigma, St Louis).
- siRNA TNF α 2'-O-methyl (*siTNF-OMe*): the same TNF α siRNA sequence described above with two 2'-O-methyl-RNA modifications (mG= 2'-O-methyl-G and mU= 2'-O-methyl-U) in the 5' overhang of the sense strand. (Sigma, St Louis).

- siRNA TNF α 2'-O-methyl/propanediol (*siTNF78*): the same TNF α siRNA sequence described above. The sense strand was modified at the 5' overhang (mG= 2'-O-methyl-G and mU= 2'-O-methyl-U) and at the 3' overhang with a propanediol group, CH₂ (CH₂OH)₂, resulting in a 5'(mG)(mU)GCCUAUGUCUCAGCCUC-dT-dT-propanediol-3' sense strand sequence. *This molecule was synthesized at Dr. Ramón Eritja's laboratory (Institute for Research in Biomedicine, IRB Barcelona, Spain).*
- siRNA scramble OMe (*siScr-OMe*): a siRNA duplex scrambled as negative control sequence with two 2'-O-methyl-RNA modifications (mC= 2'-O-methyl-C and mA= 2'-O-methyl-A) in the 5' overhang of the sense strand. Sense scrambled strand 5'-mCmAGUCGCGUUUGCGACUGG-dT-dT-3' and antisense scrambled strand 5'-CCAGUCGCAAACGCGACUG-dT-dT-3' (Sigma, St Louis).
- HeLa (human cervical adenocarcinoma epithelial cells, ATCC # CCL-2™) and murine 4T1 (murine breast carcinoma cells, ATCC # CRL-2539™).
- Dulbecco's modified Eagle's medium with L-glutamine (DMEM, Cat. # 41965, Gibco®).
- C57BL/6 healthy female mice (10 weeks old, 18-20 g body weight) purchased from HARLAN (Holand).
- Dextran sulphate sodium salt (DSS, MP Biomedicals; MW 36-50 kD, Cat. # 0218055890).
- Ketamine (Merial Labs) / Xilazine (Bayer); 55/15 mg/Kg diluted in saline; administration volume 10 mL/Kg).
- RNase free water, siRNA resuspension buffer (Dharmacon).
- Lipofectamine™ 2000 (Cat. # 11668500), OptiMEM® (Cat. # 11058-021), lipofectin® (Cat. # 18292011) and oligofectamine™ (Cat. # 12252011) (Invitrogen, CA, USA).
- DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methylsulfate; Cat. # 11 202 375 001, Roche).
- Isoflurane (Isoba®vet, Shering-Plough).
- RNALater® reagent (AM7024, Ambion, Applied Biosystems, CA, USA).
- Hexadecyltrimethyl ammonium bromide (HTAB, H9151, Sigma).
- o-dianisidine dihydrochloride (D3252, Sigma).
- H₂O₂ 1% (Sigma).
- RNeasy Mini kit (Cat. # 74104, QIAGEN).
- Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (code # 27-9264-01, Amersham Biosciences).
- TaqMan® probes for TNF α (Mm 00443258-m1); IFIT-1 (Mm 00515153-m1); IFN- β (Mm 00439552-s1) (*Assay on Demand Gene Expression* commercial kits, PE Applied Biosystems).
- TaqMan® Universal Master Mix (Applied Biosystems).
- Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (TaqMan® rodent GAPDH control reagents, Cat.# 4308313, Applied Biosystems) as housekeeping.
- 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES, Cat. # 15630-049, Invitrogen).
- Murine TNF α ELISA kit (BMS607/2INST, Bender MedSystems).
- Murine SAA ELISA kit (KMA0011C, Biosource, Invitrogen,).

ESQUEMA DE CÉLULAS



ESQUEMA DE MOLÉCULAS



Citocinas



CD40



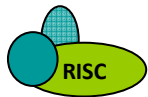
CD40 L (ligando)



Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de tipo I



Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de tipo II



Complejo silenciador RISC



DNA plasmídico (pDNA)



Enzima DICER



Factores del complemento



Factores de transcripción



Inmunoglobulinas (Igs)



Proteínas antimicrobianas



R de unión a LPS (CD14)



Ribosoma

Publicaciones generadas por los estudios de la tesis

Los resultados incluidos en esta memoria han sido presentados en los siguientes congresos científicos:

2007 “Congress of the European Crohn’s and Colitis Organisation (ECCO)”, Innsbruck (Austria).

- ‘Therapeutic efficacy against murine DSS-induced colitis of two gene transfer vectors inducing generalized IL-10 over-expression’

Autores: C. Romero, J.F. Burgueño, F.X. Blasco, J. Boada, J.C. Perales, A. Río, M.Chillón, M.A. Gassull & E. Fernández.

JCC Journal of Crohn’s and colitis. Vol 1, Issue 1. March 2007. ISSN 1873-9954.

- ‘Biosafety and biodistribution of chimeric adenoviruses to the gastrointestinal tract: a new approach to selective gene delivery to the intestine’

Autores: C. Romero., E. Rodriguez, J.F. Burgueño, M. Ferrer, H. Hamada, A. Río, M. Chillón, M.A. Gassull & Fernández E. Tipo de participación: Póster.

JCC Journal of Crohn’s and colitis. Vol 1, Issue 1. March 2007. ISSN 1873-9954.

2007 “10th Annual meeting of the American Society of Gene Therapy (ASCGT)” Seattle, Washington, USA. May 30- June 2. (Comunicación oral).

- ‘Differential biodistribution and physical properties of chimeric Ad5/40S are associated to Ad40 short fiber’

Autores: Ester Rodríguez, Carol Romero, Mireia Ferrer, Joan F. Burgueño, Adolfo Rio, Assumpcio Bosch, Estel Gil, Hirofumi Hamada, Ester Fernández & Miguel Chillón.

Mol Ther 15: S1; doi:10.1038/sj.mt.6300198

2006 “9th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy (ASCGT)”. Baltimore, Maryland, USA. May 31- June 4. (Comunicación oral).

- ‘Therapeutic potential of the chimeric Adenovirus 5/40 as Vector for intestine-directed gene therapy’

Autores: Ester Rodríguez, Carolina Romero, Mireia Ferrer, Joan F. Burgueño, Ester Fernández, Estel Gil, Hirofumi Hamada, Assumpcio Bosch & Miguel Chillón.

Mol Ther 13: S5-S5; doi:10.1016/j.ymthe.2006.08.023

Los resultados correspondientes a los capítulos 1 y 4 de la presente tesis han sido sometidos a las siguientes revistas:

- ‘Therapeutic efficacy of systemic IL-10 in colitis: Advantages of CpG-free plasmids versus adenoviral vectors’

Autores: C. Romero, J.F. Burgueño, F.X. Blasco, J. Boada, J.C. Perales, A. Río, M.Chillón, M.A. Gassull & E. Fernández. (Sometido a *Journal of Gene Medicine*).

- *'Functionally enhanced siRNA targeting TNF α attenuates DSS-induced colitis and reduces TLR-mediated immunostimulation in mice'*

Autores: Sandra M. Ocampo*, Carolina Romero*, Anna Aviñó, Joan Burgueño, Miguel A. Gassull, Jordi Bermúdez, Ramon Eritja, Ester Fernandez & Jose C. Perales. **Equally contribution. (Sometido a Molecular Therapy).*

Como resultado de los estudios incluidos en el capítulo 4 de la presente tesis se ha depositado una patente:

Titulo: *'Small Interference RNA and their use'*

Autores: Sandra M. Ocampo, Carolina Romero Prada, Ramón Eritja, Joan Burgueño, Ester Fernández & José Carlos Perales.

Propietarios: CSIC, Universitat de Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona.

Fecha de prioridad: 4 Noviembre 2010.

Nº Registro: P201031622. N/Ref.: IP1641.707. / ES1641.707.

Los resultados de los capítulos 2 y 3 de la presente tesis se encuentran en forma de manuscrito y serán sometidos próximamente.

- *'Impact of IL-10 in the host immune responses towards adenoviral vector readministrations'*
Carolina Romero *et al.*

- *'Biosafety and Biodistribution of chimeric Adenoviruses to the gastrointestinal tract: A new approach to selective gene delivery to the intestine'* Carolina Romero & Ester Rodriguez *et al.*



“La vida es como una obra de teatro; la diferencia es que la vida es un estreno continuo y no se pueden corregir los errores”

“Si es verdad que la vida es un teatro, en ocasiones me gustaría que el apuntador hablara más alto”

ANÓNIMO

