



Universitat Autònoma de Barcelona

CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA ANIMAL Y TERAPIA GÉNICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA
MOLECULAR Y BIOMEDICINA

**INMUNOMODULACIÓN DE LA VÍA TH17
CON VECTORES VIRALES PORTADORES DEL
RECEPTOR SOLUBLE DE IL23:
UNA NUEVA ESTRATEGIA DE TERAPIA GÉNICA
PARA EL TRATAMIENTO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

TESIS DOCTORAL

MARTA MIRALLES CONSUEGRA

Julio, 2014



Universitat Autònoma de Barcelona

**INMUNOMODULACIÓN DE LA VÍA TH17
CON VECTORES VIRALES PORTADORES DEL
RECEPTOR SOLUBLE DE IL23:
UNA NUEVA ESTRATEGIA DE TERAPIA GÉNICA
PARA EL TRATAMIENTO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

Memoria presentada por

Marta Miralles Consuegra

Para optar al grado de

Doctor en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

Tesis realizada bajo la dirección del Dr. Miguel Chillón, del Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica y del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona

El director

Doctoranda

Miguel Chillón Rodríguez

Marta Miralles Consuegra

Julio, 2014

A mis padres

A Víctor

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	7
I. INTRODUCCIÓN	11
1. LA VÍA DEL TH17	13
1.1. <i>La respuesta autoinmune</i>	13
1.1.1. La dicotomía Th1/Th2	13
1.1.2. El descubrimiento de la IL23 y la Th17	14
1.2. <i>Función natural de la Th17</i>	16
1.3. <i>Desarrollo de las células Th17 en ratón</i>	18
1.3.1. Diferenciación: IL6 y TGFβ	18
1.3.2. Amplificación: IL21	19
1.3.3. Estabilidad: IL23	19
1.4. <i>Desarrollo de las células Th17 en humanos</i>	20
1.5. <i>IL17 e inflamación</i>	21
2. ENFERMEDADES AUTOINMUNES	23
2.1. <i>Esclerosis Múltiple (EM)</i>	23
2.1.1. Descripción y sintomatología	23
2.1.2. Diagnóstico	25
2.1.3. Evolución clínica	27
2.1.4. Aspectos psicológicos y sociales de la EM	29
2.1.5. Epidemiología	29
2.1.6. Inmunopatología	31
2.1.7. Tratamientos actuales de la EM	32
2.1.8. Encefalomiелitis Experimental Autoinmune	35
2.2. <i>Enfermedad de Crohn (EC)</i>	37
3. TERAPIA GÉNICA	39
3.1. <i>Descripción</i>	39
3.2. <i>Vectores virales</i>	40
3.2.1. El vector ideal	42
3.2.2. Virus adenoasociados (AAVs)	42
3.2.3. Adenovirus	47
3.2.4. Virus quiméricos	51
II. OBJETIVOS	53

III. RESULTADOS	57
1. DESARROLLO DE ESTRATEGIAS DE TERÁPIA GÉNICA PARA ENFERMEDAD DE CROHN	59
1.1. <i>El gen: clonación del gen IL23R soluble humano en el genoma viral</i>	59
1.2. <i>El vector: generación y producción de los vectores virales</i>	60
1.2.1. Adenovirus quimera Ad5/40S	61
1.2.1.1. Artículo: Efficient Amplification of Chimeric Adenovirus 5/40S Vectors Carrying the Short Fiber Protein of Ad40 in Suspension Cell Cultures	63
1.2.1.2. Patente: Método para la producción de adenovirus mosaico	75
1.2.2. Adenovirus 5	79
1.2.3. Virus adenoasociados	82
1.3. <i>Estudio de tropismo celular en intestino</i>	84
1.4. <i>Modelo animal para Enfermedad de Crohn</i>	86
2. DESARROLLO DE ESTRATEGIAS DE TERÁPIA GÉNICA PARA ESCLEROSIS MÚLTIPLE	89
2.1. <i>Diseño del IL23R soluble murino y clonación en los genomas virales</i>	90
2.2. <i>Generación y producción de los vectores virales</i>	93
2.3. <i>Estudio del tropismo en células T CD4+ purificadas de diferentes pseudotipos de AAV y serotipos de Ad</i>	95
2.4. <i>Interacción in vitro entre IL23 e IL23Rs</i>	98
2.4.1. Detección de IL23Rs secretado al medio extracelular	98
2.4.2. Análisis de la interacción IL23-IL23Rs in vitro	101
2.5. <i>Estudio de distribución celular de IL23R e IL23Rs</i>	103
2.6. <i>Análisis del potencial inmunomodulador del IL23Rs en un modelo animal para Esclerosis Múltiple (EAE)</i>	106
2.6.1. Diseño experimental	106
2.6.2. Efecto de la administración de vectores virales en ratones con EAE	108
2.6.3. El grupo administrado con vectores portadores de secuencias irrelevantes como grupo control del experimento	110
2.6.4. Estudio comparativo entre vectores Ad5-CMV-IL23Rs y AAV9-CMV-IL23Rs en ratones con EAE	113
2.6.5. Inmunomodulación de la EAE mediante la administración de vectores AAV portadores de IL23Rs	117
2.6.6. Análisis inmunológico de los ratones tratados con AAV8-CAG-IL23Rs	121
2.6.7. Estudio histopatológico del SNC	123
IV. DISCUSIÓN	129
V. CONCLUSIONES	153
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	157
1. MATERIALES	159
1.1. <i>Vectores plasmídicos</i>	159
1.2. <i>Vectores virales</i>	159

1.3. Cultivos <i>in vitro</i>	159
1.4. Animales	160
2. MÉTODOS	161
2.1. <i>Obtención y análisis de DNA</i>	161
2.1.1. Minipreparaciones de DNA plasmídico por lisis alcalina	161
2.1.2. Maxipreparaciones de DNA plasmídico	161
2.1.3. Preparación de bacterias quimiocompetentes	162
2.1.4. Transformación bacteriana por choque térmico	163
2.1.5. Electroforesis de DNA en gel de agarosa	163
2.1.6. Purificación de fragmentos de DNA	164
2.1.7. Cuantificación del DNA	164
2.1.8. Digestión mediante enzimas de restricción	164
2.1.9. Clonación	164
2.1.9.1. Clonación por ligación	165
2.1.9.2. Clonación por recombinación homóloga en bacterias	165
2.1.10. Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR	166
2.1.11. Secuenciación	166
2.2. <i>Obtención y análisis de RNA</i>	167
2.2.1. Extracción del RNA de células de cultivo	167
2.2.2. Retrotranscripción	167
2.3. <i>Obtención y análisis de proteínas</i>	168
2.3.1. Extracción de proteínas	168
2.3.2. Cuantificación de proteínas	168
2.3.3. Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)	169
2.3.3.1. Electrotransferencia	170
2.3.3.2. Inmunodetección	170
2.3.4. Electroforesis no desnaturizante (one-dimensional native electrophoresis)	171
2.3.4.1. Electrophoresis no desnaturizante a pH7	172
2.3.5. Deshibridación de la membrana	172
2.3.6. Precipitación de proteínas Flag	173
2.3.7. Precipitación de proteínas GST	173
2.4. <i>Técnicas generales de cultivo celular</i>	174
2.4.1. Mantenimiento de cultivos celulares en monocapa	174
2.4.2. Criopreservación: congelación y descongelación de viales	175
2.4.3. Mantenimiento de cultivos de células Jurkat	175
2.4.4. Introducción de DNA plasmídico en células por transfección	175
2.4.5. Cultivos primarios de células T CD4+ de ratón	176
2.5. <i>Vectores virales</i>	177
2.5.1. Generación y purificación de vectores adenoasociados	177
2.5.1.1. Transfección, amplificación y purificación	177
2.5.1.2. Determinación del título de los vectores adenoasociados	179

2.5.2. Generación y titulación de vectores adenovirales	180
2.5.2.1. Preparación del genoma viral para su transfección en células HEK-293	180
2.5.2.2. Transfección y amplificación de los vectores virales	180
2.5.2.3. Purificación de los vectores adenovirales	181
2.5.2.4. Titulación de los vectores adenovirales	181
2.5.3. Producción del adenovirus quimera Ad5/40s	182
2.5.4. Infección de células con vectores virales	182
2.5.5. Análisis de la expresión de GFP por citometría de flujo	182
2.6. Ratones DSS	183
2.6.1. Inducción de colitis por DSS	183
2.6.2. Análisis de citoquinas de colon de ratón	183
2.7. Estudios <i>in vivo</i> con ratones EAE	183
2.7.1. Inducción de la EAE en ratones y seguimiento clínico	183
2.7.2. Obtención y fijación del SNC	184
2.7.3. Estudios histopatológicos	184
2.7.3.1. Hematoxilina-eosina (HE)	184
2.7.3.2. Klüver-barrera (KB)	185
2.7.3.3. Inmunohistoquímica	186
2.7.4. Ensayos inmunológicos	187
2.7.4.1. Ensayos de proliferación celular y análisis de la producción de citoquinas	187
2.7.5. Análisis estadístico	187
VII. BIBLIOGRAFÍA	189
VIII. ANEXO	215
Vectores virales generados y producidos	217
Plásmidos generados	219
Capítulo de libro: Production of Chimeric Adenovirus	221




Abreviaturas

°C	Grados celsius
A	Adenina
AAV	Virus adenoasociado
Ad	Adenovirus
Ad5	Adenovirus de serotipo 5
Ad40	Adenovirus de serotipo 40
Ad5/40s	Adenovirus quimérico, genoma del Ad5 y F40S
APC	Célula presentadora de antígeno
APS	Persulfato amónico
AU	Unidades arbitrarias
BSA	Albúmina bovina sérica
C	Citosina
CAG	CMV/chicken β -actin promoter
CAR	Receptor de Adenovirus y virus Coxsackie B
CFA	Complete Freund's Adjuvant
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CMV	<i>Citomegalovirus Major Promoter</i>
CO₂	Dioxido de carbono
cpm	Counts per minute
CsCl	Cloruro de Cesio
D.E.	Desviación estandar
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Di-metil-sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
EAE	Encefalomiелitis Experimental Autoimmune
EC	Enfermedad de Crohn
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EM	Esclerosis Múltiple
F40S	Proteína <i>fiber</i> corta del Ad40
FBS	Suero fetal bovino
g	Gravedad (unidad de fuerza centrífuga)
G	Guanina
GFP	Proteína verde fluorescente
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
GST	Glutathione-S-transferasa
HEK	Riñón Embrionario Humano
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa

IFNγ	Interferón gamma
IL	Interleuquina
IL23	Interleuquina 23
IL23R1	Receptor transmembrana IL23 humano
IL23R4	Forma soluble del IL23R humano
IL23R	Receptor transmembrana IL23 murina
IL23Rs	Forma soluble del IL23R murino
IMDM	Medio de cultivo Dulbecco modificado de Iscove
ITR	Repeticiones Terminales Invertidas
IU	Unidades infecciosas
kb	Kilobase
KCl	Cloruro potásico
l	Litro
LB	Medio Luria Broth
LMP	Leucoencefalopatía multifocal progresiva
M	Molar
MCS	Sitio de Clonación Múltiple
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MOG	Glicoproteína mielínica de los oligodendrocitos
MOI	Multiplicidad de infección
NaCl	Cloruro sódico
NaOH	Hidróxido sódico
ng	Nanogramo/s
o/n	Over night
P/S	Penicilina/Estreptomicina
pb	Pares de bases
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PEI	Polietilenimina
PFA	Paraformaldehido
PHA	Ficohemaglutinina
poliA	Secuencia de Poli-Adenilación
PP	Partículas físicas
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
SDS	Dodecilsulfato sódico
SNC	Sistema nervioso central

T	Timina
TEMED	Tetrametiletilenodiamida
Th	Células CD4+T helper
Th1	Células T helper del subgrupo 1
Th17	Células T helper del subgrupo 17
Th2	Células T helper del subgrupo 2
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha
TNF-β	Tumor necrosis factor beta
Treg	Célula T reguladora natural
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UV	Ultravioleta
V	Voltios
vg	Genomas virales
wt	Wild type
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrometro



Resumen

En las últimas décadas, la incidencia de enfermedades autoinmunes ha aumentado notablemente, ya sea por el mayor conocimiento, por la mejora en las herramientas de diagnóstico, o por los cambios en los hábitos de vida. Así, el incremento de afectados por este tipo de enfermedades se ha convertido en un problema social grave, pues trastornos autoinmunes crónicos como la Esclerosis Múltiple (EM) o la Enfermedad de Crohn (EC) pueden aparecer en etapas tempranas de la vida, afectando gravemente a su calidad. Más aún, los tratamientos actuales contra estas enfermedades son paliativos y frenan levemente su desarrollo, sin lograr evitar su transcurso a largo plazo, y provocando efectos secundarios graves muchas veces. Por otro lado, el coste de los medicamentos y los cuidados multidisciplinarios que los pacientes requieren a lo largo de su vida constituyen un problema económico-sanitario elevado, haciendo cada vez más importante la aparición de una cura eficaz.

La EC es una enfermedad inflamatoria intestinal grave que afecta especialmente al colon y al íleo, además de tener otras complicaciones sistémicas y extraintestinales. Por su parte, la EM es una enfermedad desmielinizante que afecta al SNC provocando una pérdida progresiva de la movilidad y otras complicaciones secundarias. En ambas enfermedades juega un papel muy importante la vía Th17, y por consiguiente, la IL23. De hecho, algunos tratamientos experimentales para ambas tratan de inhibir la función de IL23 mediante el uso de anticuerpos, con resultados controvertidos. Así pues, en este trabajo nos propusimos estudiar una estrategia de terapia génica no basada en el uso de anticuerpos, sino en un vector viral portador de IL23R soluble (IL23Rs), que se uniera a IL23 y redujera su acción.

En la primera parte, nos centramos en la EC y en la obtención del vector viral idóneo para terapia intestinal. El adenovirus quimera Ad5/40S, con un marcado tropismo intestinal cumple estos requisitos. Sin embargo, su producción *in vitro* era muy ineficiente, por lo que se desarrolló un método optimizado de producción, basado en el uso de células 211B en suspensión y polybrene durante las infecciones en el proceso de amplificación viral.

Por otra parte, también se realizaron dos estudios de tropismo con diferentes vectores virales: *in vitro* en linfocitos T CD4+, demostrando que el Ad5/40S es el vector que

mejor infecta, e *in vivo*, estudiando el tropismo celular en intestino y demostrando que ninguno de los vectores virales infecta eficientemente las *stem cells* de las criptas de Lieberkühn.

Debido a que no obtuvimos un perfil Th17 en el modelo de colitis inducida por DSS, en la segunda parte del trabajo nos centramos en la EM. Primeramente, se diseñó el IL23Rs murino, que fue clonado en diferentes vectores virales. Seguidamente, se demostró que células infectadas con estos vectores secretaban IL23Rs al exterior celular y que IL23Rs se unía a IL23 *in vitro*.

Finalmente, los vectores portadores de IL23Rs se probaron en un modelo murino de EM, la Encefalomiелitis Autoinmune Experimental. Los resultados expuestos en este trabajo indican que la expresión de IL23Rs tiene un efecto beneficioso en la evolución clínica de la enfermedad, retrasando la aparición de los primeros síntomas y reduciendo la gravedad de los mismos hasta el final del seguimiento clínico. Asimismo, en concordancia con la mejora clínica observada, los ratones tratados no presentan evidencias de desmielinización, además de tener una menor inflamación y una respuesta astrogliol y microglial significativamente menor en médula espinal.

En resumen, nuestros resultados sugieren que el empleo de una terapia génica inmunomoduladora para EM basada en el uso de vectores virales portadores de IL23Rs podría tener un efecto terapéutico en el desarrollo de la enfermedad.



I. Introducción

1. LA VÍA DEL Th17

1.1. La respuesta autoinmune

1.1.1. La dicotomía Th1/Th2

Durante años la hipótesis de la dicotomía Th1/Th2 sirvió a la comunidad científica para tratar de entender y explicar los complejos mecanismos que acontecen en el desarrollo de las enfermedades infecciosas y alérgicas. Esta hipótesis, establecida por primera vez por Mossman y Coffman en sendos artículos (Coffman and Carty, 1986; Mosmann et al., 1986) supuso un gran avance en el entendimiento del sistema inmunológico. Para ella se basaron en la observación de la existencia de una polaridad funcional en dos subgrupos de células CD4⁺ T helper (células Th), las cuales expresaban un perfil de citoquinas diferente, fundamentales para determinar la función de dichas células. De esta forma, las células Th del subgrupo 1 (Th1) parecían inducir la respuesta inmune celular contra virus o patógenos intracelulares (Sacks and Noben-Trauth, 2002), mediante la secreción de INF- γ , IL2 y TNF- β , y activando los macrófagos. En cambio, las células Th del subgrupo 2 (Th2), producían las IL4, IL5, IL10 e IL13 capaces de iniciar la respuesta inmune humoral y el control de infecciones por helmintos (Anthony et al., 2007). Curiosamente, por aquél entonces Coffman también predijo que ambas vías se regularían mutuamente mediante la secreción de citoquinas efectoras, hipótesis que fue ampliamente validada por numerosos estudios genéticos y moleculares llevados a cabo posteriormente (McGeachy and Cua, 2008).

Durante mucho tiempo se creyó que las enfermedades autoinmunes eran inducidas por células autoreactivas de la vía del Th1 (Druet et al., 1995). Esta hipótesis fue adquiriendo más fuerza con el surgimiento de artículos donde se mostraban datos que apuntaban en esta dirección. En efecto, clones de células T derivados de pacientes con Esclerosis Múltiple expresaban un perfil de producción de citoquinas típico de la vía del Th1 (Zhang et al., 1994). Por otra parte, los intentos de utilizar el IFN γ como terapia para la Esclerosis Múltiple resultaron en una exacerbación de la enfermedad (Panitch et al., 1987). Además las células T procedentes del líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide producían un perfil de citoquinas típico de Th1 (Katsikis et al.,

1994). También se encontraron razones para pensar que una respuesta anómala de las células Th1 mediaba en parte otras enfermedades autoinmunes como psoriasis o enfermedad inflamatoria intestinal (Bouma and Strober, 2003; Lowes et al., 2007).

Sin embargo, por muy útil que fuese el paradigma Th1/Th2 en el entendimiento de bastantes enfermedades, sobretodo de tipo infeccioso o alérgico, no era suficiente para explicar algunos aspectos de las patologías de carácter autoinmune, existiendo muchas inconsistencias cuando se trataba con este tipo de trastornos.

1.1.2. El descubrimiento de la IL23 y la Th17

En la década de los 90, los investigadores llevaban a cabo repetidos experimentos en los que se ponía de manifiesto el papel de la IL12 (típicamente Th1) en el desarrollo de las enfermedades autoinmunes. Estos experimentos llevados a cabo en ratones demostraban que el tratamiento con anticuerpos neutralizantes anti-IL12 prevenía la aparición de enfermedades tales como la artritis inducida por colágeno (collagen-induced arthritis o CIA) (Adorini et al., 1997), la encefalomiелitis autoinmune experimental (experimental autoimmune encephalomyelitis o EAE) (Leonard et al., 1995), o la enfermedad inflamatoria intestinal crónica (IBD) (Blumberg et al., 1999).

Posteriormente, en el año 2000, mientras Oppmann y colaboradores, del DNAX Research Institute, trabajaban buscando homólogos de la subfamilia de proteínas IL6 mediante un *“computacional sequence screen”*, detectaron una cadena de citoquinas desconocida hasta la fecha, la p19. Descubrieron que esta cadena formaba heterodímeros con la cadena p40 de la IL12; y llamaron a esta nueva citoquina, formada por la p40 y la p19, interleuquina-23 (IL23) (Oppmann et al., 2000). Tras la publicación de este estudio empezó lo que sería una revolución en el conocimiento de las enfermedades autoinmunes.

Tanto es así, que con la llegada de la nueva citoquina, los estudios anteriormente citados y otros fueron invalidados; debido a que habían sido realizados mediante la utilización de anticuerpos anti-p40, los cuales no solo detectaban la IL12 sino también la IL23. En consecuencia, fue necesario esclarecer cual de las dos citoquinas era la responsable de tales efectos.

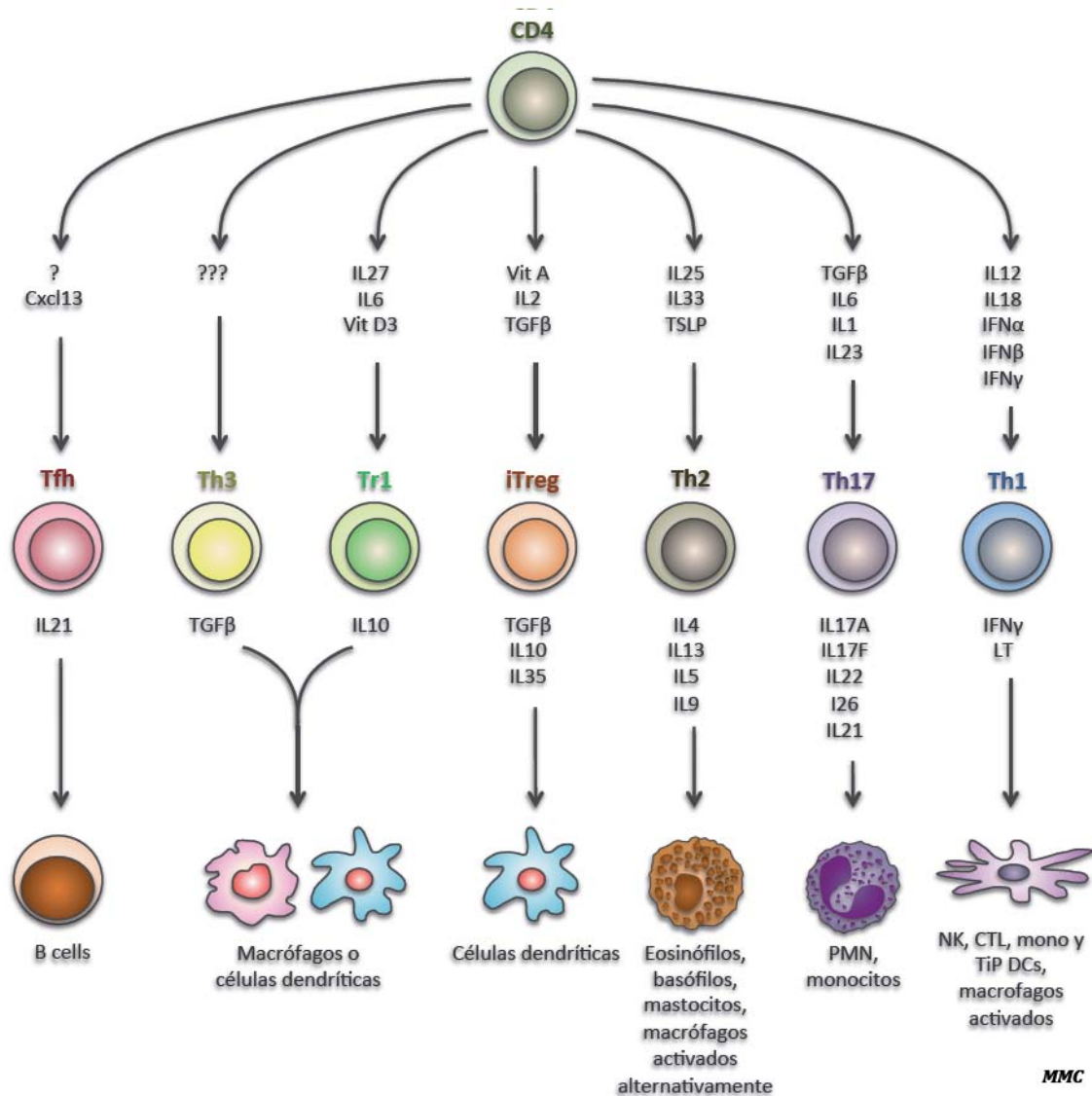


FIGURA 1. Subgrupos de células T helper CD4+ y su papel en la regulación de la inflamación de tejidos linfoides periféricos (adaptado de (Locksley, 2008))

Con este propósito, se llevaron a cabo estudios *in vivo* en ratones deficientes para una u otra subunidad: ratones deficientes para p19 (carencia de IL23), deficientes para la p40 (carencia de IL12 y de IL23), y deficientes para p35 (carencia de IL12). Con ello se demostró que solo los ratones deficientes para la IL23 eran resistentes al desarrollo de EAE y CIA, mientras los ratones deficientes únicamente para la IL12 seguían siendo susceptibles para el desarrollo de dichos modelos de enfermedad (Murphy et al., 2003). Por otra parte, ratones tratados con anticuerpos anti-IL23 no desarrollaban EAE (Chen et al., 2006), mientras que ratones deficientes para el receptor β de la IL12 sucumbían a la enfermedad (Zhang et al., 2003). Así pues, una vez esclarecido el papel

fundamental de la IL23 en el desarrollo de las enfermedades autoinmunes, otras cuestiones requerían ser resueltas: ¿Debían entenderse los trastornos autoinmunes como un mal funcionamiento de la vía Th1? ¿Por consiguiente, era razonable pensar que la nueva interleuquina-23, pertenecía a esta vía?

La respuesta no se hizo esperar, en el año 2005, Langrish y colaboradores (Langrish et al., 2005) demostraron que la IL23 era capaz de generar y expandir células T productoras de IL17, y que la transferencia de estas células a ratones naive wild-type, inducía la EAE.

Éste y otros estudios similares hicieron que los investigadores propusieran que las células T productoras de IL17 constituían *per se* un subgrupo de células T helper diferente, se les llamó Th17 (**Figura 1**) (Harrington et al., 2005; Langrish et al., 2005; Park et al., 2005).

1.2. Función natural de la Th17

Como todas las células pertenecientes al Sistema Inmune, cuando las células de la vía del Th17 se encuentran en un estado fisiológico convenientemente regulado, desempeñan una función natural, útil para el organismo (**Figura 2**). En el caso de las células Th17, éstas tienen un papel clave en el mantenimiento de la barrera homeostática posterior al daño epitelial. Por una parte, la IL22, secretada por las células Th17, activa respuestas de defensa y de reparación epitelial; mientras que la IL17, también secretada por estas células, provoca la llegada de neutrófilos al lugar (McGeachy and Cua, 2008; Ouyang et al., 2008).

Así mismo, también ha sido descrita la capacidad protectora de las interleuquinas IL17, IL22 e IL23, todas ellas secretadas por células Th17, para restringir infecciones ocasionadas por patógenos extracelulares de índole diversa; desde bacterias Gram-positivas como *Propionibacterium acnes*, hasta bacterias Gram-negativas como *Klebsiella pneumoniae* o *Citrobacter rodentium* (Happel et al., 2005; Infante-Duarte et al., 2000; Khader et al., 2007; Ye et al., 2001). También sucede en patógenos fúngicos

tales como *Pneumocystis carinii* y *Candida albicans* (Huang et al., 2004; Rudner et al., 2007).

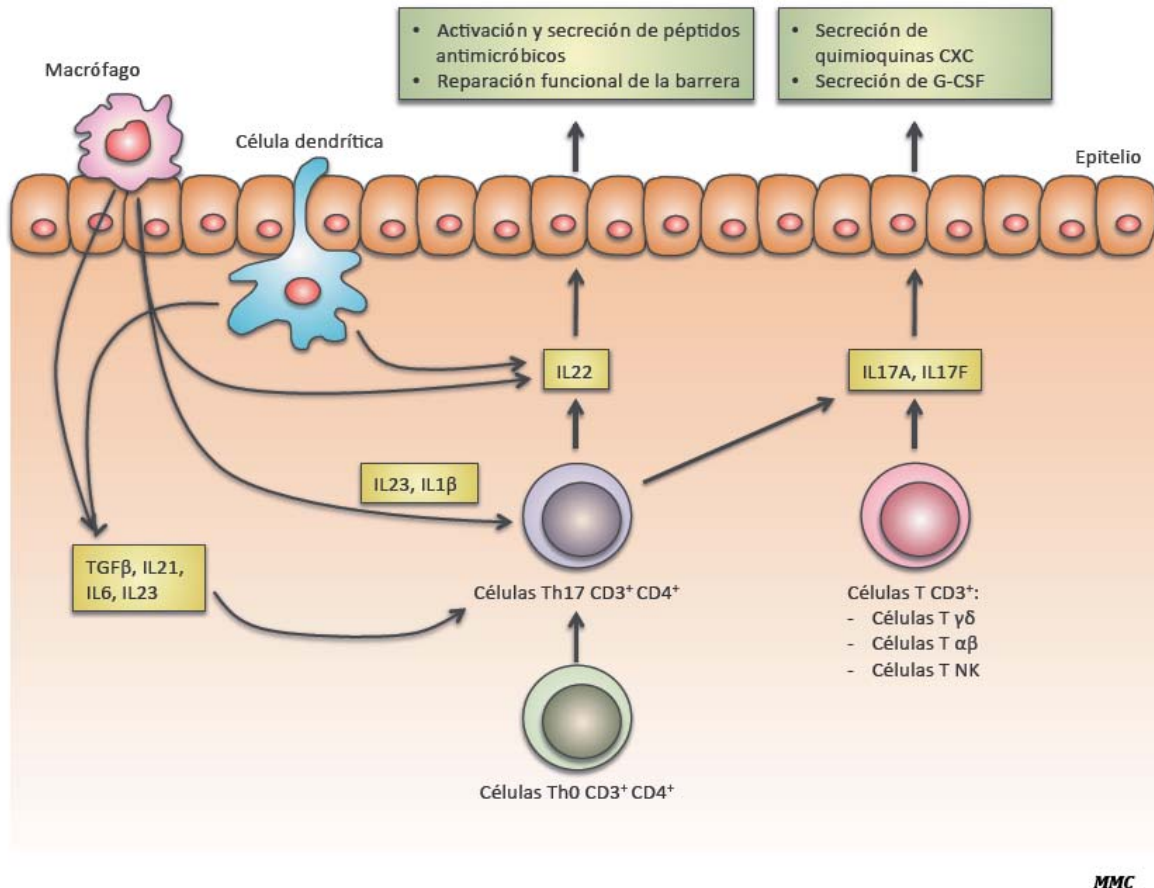


Figura 2. Funciones clave de la vía del Th17 en la defensa inmune (adaptado de (Miossec and Kolls, 2012))

Por otra parte, se ha descrito extensamente el papel que la vía del Th17 tiene en la granulopoyesis, siendo la IL17 crítica en la regulación de ésta bajo situaciones de estrés (Ouyang et al., 2008). De hecho, según Schwarzenberger (Schwarzenberger et al., 2000; Schwarzenberger et al., 1998) la sobreexpresión de IL17A sistémica ocasiona una hematopoyesis extramedular masiva en ratones, debido a la inducción de GM-CSF endógena, así como SCF (stem cell factor).

1.3. Desarrollo de las células Th17 en ratón

1.3.1. Diferenciación: IL6 y TGFβ

El receptor de la IL23 no se expresa en células T naive (Miossec and Kolls, 2012), por lo que otras citoquinas están involucradas inicialmente en la diferenciación de estas células hacia Th17. En 2006 se publicaron varios estudios que concluían que para el desarrollo temprano de las células Th17 se requería la presencia de IL6 y TGFβ, así como las vías de señalización mediadas por STAT3. Estas dos citoquinas históricamente opuestas, actúan sinérgicamente en la inducción del factor de transcripción RORγt (Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2006a; Yang et al., 2007). Aunque el anterior es reconocido como el principal mecanismo, se ha observado que TGFβ puede también actuar en sinergia con la IL21 en la inducción de RORγt y IL17 en células T naive (Korn et al., 2007; Nurieva et al., 2007).

CARACTERÍSTICAS DE ALGUNAS LÍNEAS DE CÉLULAS T CD4 ⁺				
	Células Th1	Células Th2	Células Th17	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs
Perfil de producción de citoquinas	IL2 IFNγ TNFα	IL4 IL5 IL6 IL10 IL13	IL17A IL17F IL21 IL22	TGFβ IL10
Función protectora	Patógenos intracelulares	Parásitos Inmunidad humoral	Bacterias patógenas extracelulares	Protección hacia la autoinmunidad
Función patogénica	Autoinmunidad (?)	Alergia Asma	Autoinmunidad Inflamación, Cáncer	Promueve inducción a la tolerancia Inmunodeficiencia Cáncer
Efectos de citoquinas sobre su diferenciación:				
IL2	-	+	±	+
IL4	±	+	-	?
IL6			+(con TGFβ)	-
IL12	+		-	
IL23	-	-	+(supervivencia)	
IL27	± (?)	-	-	
IFNγ	0		-	+
TGFβ	-	-	+(con IL6)	+
Factor de transcripción clave	T-bet	GATA3	RORγt	FoxP3

TABLA 1. Características de algunas células T CD4+ (Yamamoto et al., 1976).

De la misma manera que con la IL6, el requerimiento absoluto de TGFβ para la diferenciación de estas células ha sido cuestionado recientemente, debido a la

presencia de células Th17 en el intestino de ratones deficientes para la TGF β (Ghoreschi et al., 2010; Qin et al., 2009). En efecto, la combinación de IL6 e IL23, juntamente con IL1 β , es capaz de inducir la producción de IL17 en ausencia de TGF β (Ghoreschi et al., 2010).

Tal como ocurre con la diferenciación de las células Th1 y Th2, las células Th17 disponen de unos factores de transcripción propios y específicos: ROR γ t y ROR α t (RORC en humanos). Ambos son necesarios para la diferenciación de Th17 (Dong, 2011).

1.3.2. Amplificación: IL21

Además de la comentada capacidad de la IL21 para inducir la diferenciación de Th17 en sinergia con TGF β , la IL21 juega un papel clave en la amplificación de este subgrupo celular. Curiosamente, las propias células Th17 son las mayores productoras de IL21, estableciéndose un bucle autocrino de amplificación y potenciándose su diferenciación (Korn et al., 2007; Nurieva et al., 2007; Wei et al., 2007; Zhou et al., 2007). De hecho, se cree que en situaciones de no-inflamación, cuando los niveles de IL6 son muy bajos, la IL21 producida por las propias células Th17, las células NK y las NKT es importante para mantener y amplificar la población de precursores de células Th17 (Korn et al., 2007; Korn et al., 2009).

1.3.3. Estabilidad: IL23

Se ha podido demostrar que la combinación de TGF β con IL6/IL21 induce la aparición del receptor de IL23 (IL23R) en la superficie de las células Th17 diferenciadas. Además, la IL23 actúa sinérgicamente con IL6 en la potenciación, diferenciación, supervivencia y estabilidad de las células Th17 (McGeachy et al., 2009; Zhou et al., 2007) mediante la inducción de citoquinas proinflamatorias como: IL1 β , TNF α y IL6 en las células inmunes innatas (Korn et al., 2009). Así pues, varias publicaciones demuestran que la IL23 es necesaria para el mantenimiento de las Th17 *in vitro* y para la inducción de la inflamación tisular originada por células Th17 generadas *in vitro*. Además, también lo es para la inflamación crónica *in vivo* mediada por Th17 (McGeachy et al., 2009;

Veldhoen et al., 2006b). Por otro lado, la deficiencia en IL23 (p19) está claramente asociada al descenso de células Th17 *in vivo*.

1.4. Desarrollo de las células Th17 en humanos

Hoy en día se conoce que la diferenciación de las células Th17 en humanos no dista mucho de la murina. Sin embargo, a lo largo del 2007 fueron publicados algunos estudios que defendían que, contrariamente a lo establecido en ratón, el TGF β no era indispensable para la diferenciación de las células Th17 (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Wilson et al., 2007). Sin embargo, estos estudios fueron refutados debido a errores en el diseño de los mismos: se utilizaron células mononucleares humanas procedentes de sangre periférica, y su diferenciación, supuestamente en ausencia de TGF β , se hizo en presencia de suero y con plaquetas contaminantes (las plaquetas son una de las principales fuentes de TGF β). Actualmente, los datos disponibles sugieren que de forma parecida a lo descrito anteriormente en ratones, la TGF β parece ser indispensable para la diferenciación de células Th17 humanas a partir de células naive (**Figura 3**) (Manel et al., 2008; Volpe et al., 2008; Yang et al., 2008).

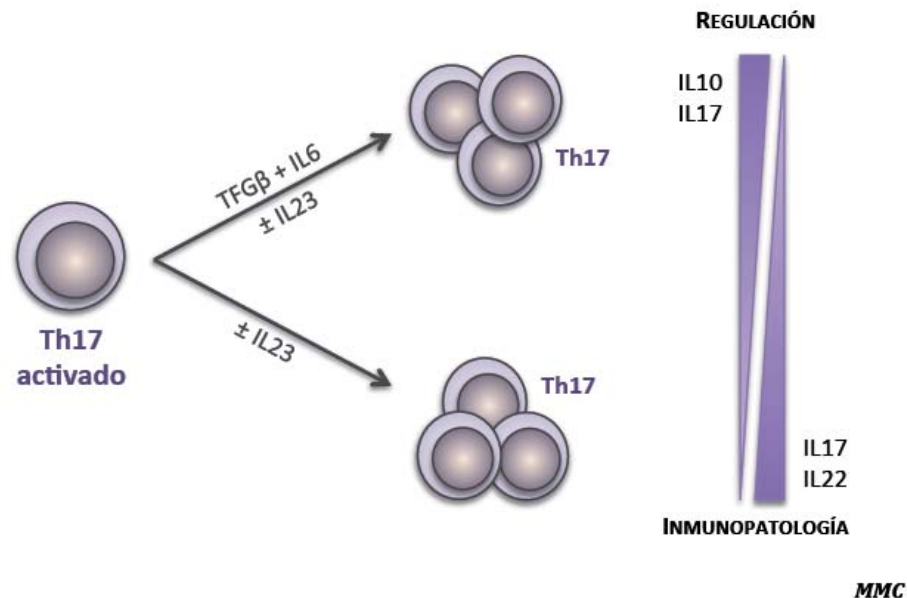


FIGURA 3. Regulación de la respuesta celular de Th17 por IL10 inducida por TGF β e IL6 (adaptado de (McGeachy and Cua, 2008).

A pesar de esta necesidad de TGF β para la inducción de RORC, es importante remarcar que en solitario y en concentraciones elevadas, TGF β realiza la función contraria, mediante la inhibición de RORC (Manel et al., 2008). Esto forma parte de su papel como activador de la diferenciación de las células T reguladoras (Treg). Sin embargo, en presencia de citoquinas inflamatorias como IL21, IL1 β , IL6 e IL23; TGF β cesa su función inhibidora de RORC y ayuda a desencadenar la expresión de IL17 (Manel et al., 2008; Volpe et al., 2008; Yang et al., 2008). Esta duplicidad de TGF β , una citoquina presente en varias vías, la observamos también para Th1. Así, además del papel de TGF β en la activación de las células Th17, TGF β favorece la proliferación de estas células mediante su capacidad inhibidora de la expresión de T-bet, factor de transcripción clave de Th1 (Santarlasci et al., 2009).

Originalmente, las células T naive no expresan en su superficie receptores para IL1 (IL1R) ni para la IL23 (IL23R). No obstante estos receptores son expresados después de la exposición con TGF β y IL6/IL21, convirtiendo estas células reactivas a estas citoquinas (Lee et al., 2010; Yang et al., 2008). Se postula que TGF β juntamente con IL1 es suficiente para inducir la diferenciación de las células Th17 humanas a partir de células T naive, mientras que IL1 β y IL6 son importantes para potenciar la expansión de las células diferenciadas y de memoria (Yang et al., 2008).

Por consiguiente, podemos concluir, con los datos disponibles actualmente, que las citoquinas requeridas para la diferenciación de Th17 humanos y ratones son similares.

1.5. IL17 e inflamación

La IL17 es una citoquina altamente inflamatoria con efectos pleiotrópicos que actúa sobre varios tipos celulares que expresan el receptor de IL17, tales como células inmunes, células epiteliales o fibroblastos (**Figura 4**).

Cuando el receptor de la IL17 se activa se desencadena la producción de citoquinas inflamatorias tales como la IL6, IL1 β , TNF y GM-CSF, entre otras. A la vez que se secretan también quimioquinas del tipo: CXCL8, CCL3, CCL2. Todo ello promueve el

reclutamiento y la activación de neutrófilos, linfocitos y macrófagos, provocando inflamación local y daño tisular (Ambrosi et al., 2012; Gaffen, 2008).

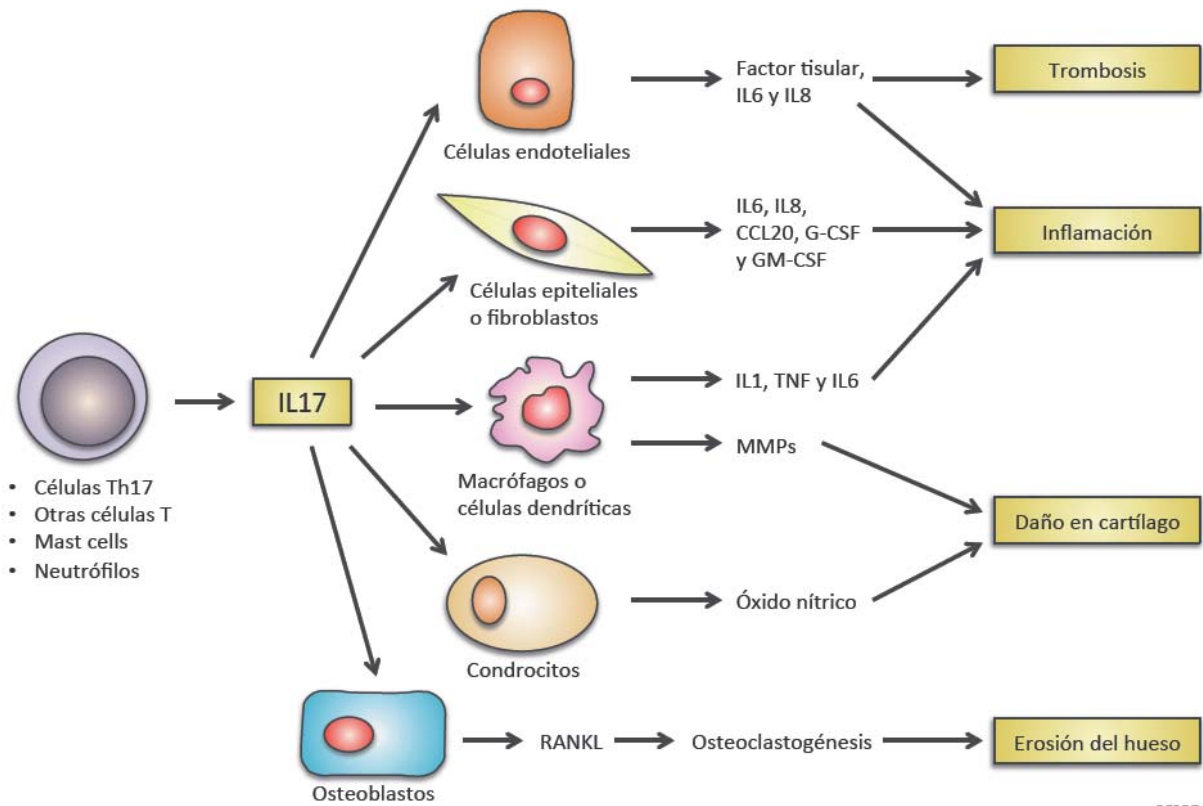


FIGURA 4. Principales funciones de la IL17, implicaciones en la inflamación y destrucción matricial (adaptado de (Miossec and Kolls, 2012).

2. ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Las enfermedades autoinmunes son cada vez más frecuentes en nuestra sociedad. Algunas de ellas son raras, otras en cambio, se encuentran con una frecuencia preocupantemente en aumento. Sin embargo, consideradas en conjunto afectan a millones de personas en todo el mundo. Se producen cuando el organismo desarrolla una respuesta inmune anómala e inadecuada contra sus propios tejidos, células u órganos. En estos casos el sistema inmunológico se vuelve incapaz de reconocer como propios a uno o varios tejidos o células o componentes del organismo, creando autoanticuerpos contra estos, y provocando la aparición de procesos inflamatorios y lesiones.

La etiología de las enfermedades autoinmunes sigue siendo desconocida hoy en día, pero se ha podido observar que existe una predisposición genética o susceptibilidad hereditaria a padecer este tipo de trastornos. Por otra parte, con frecuencia se observa la existencia de factores ambientales de índole diversa (biológicos como virus o bacterias; o físico-químicos) que pueden promover el desarrollo de la enfermedad autoinmune.

Por lo general, las enfermedades autoinmunes se clasifican en dos grandes categorías: enfermedades autoinmunes sistémicas, que afectan a múltiples órganos, y enfermedades autoinmunes localizadas, que afectan a un solo órgano o tejido. No obstante, establecer la diferencia entre un tipo u otro no es fácil, ya que el efecto de algunos trastornos autoinmunes localizados se extiende frecuentemente más allá del órgano o tejido afectado.

2.1. Esclerosis Múltiple (EM)

2.1.1. Descripción y sintomatología

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria crónica y desmielinizante que afecta al Sistema Nervioso Central (SNC). Mayoritariamente aparece en adultos jóvenes. Se caracteriza por un deterioro neurológico que afecta al cerebro, a la médula

espinal y al nervio óptico; provocando frecuentemente una discapacidad y minusvalía progresivas.

SÍNTOMAS	TRATAMIENTOS
Síntomas primarios	
Neuritis óptica: dolor en el movimiento ocular, visión borrosa, disminución de la visión del color	corticosteroides seguidos de dosis orales para reducir la inflamación
Espasticidad: alteración de la marcha, problemas de equilibrio, falta de coordinación	Fisioterapia, ejercicios de estiramiento y fortalecimiento, antiespasmódicos como el baclofeno (Lioresal y otros) o la tizanidina (Zanaflex, Sirdalud), el bloqueador del canal de potasio dalfampridine (Ampyra) para mejorar la marcha
Fatiga: cansancio, dificultad para concentrarse	Ejercicio, mejora en los hábitos de sueño, medicamentos como la amantadina (Symadine, Symmetrel) o modafinilo (Provigil)
Depresión clínica: desesperanza, pérdida del apetito, problemas para dormir	Derivación a un psiquiatra, psicoterapeuta, o un trabajador social, un antidepresivo puede estar indicada
Quejas somatosensoriales: hormigueo, entumecimiento, dolor, ardor	Medicamentos para el dolor neuropático como la gabapentina (Neurontin y otros), amitriptilina (Elavil y otros), o la carbamazepina (Tegretol y otros)
Debilidad muscular focal: pérdida de coordinación motora fina, caídas, dificultad para caminar, debilidad en las extremidades	Dispositivos de ayuda, terapia física o ocupacional, remisión a un fisioterapeuta
Disfunción de la vejiga y del intestino: pérdida de la capacidad de retener la orina o vaciar la vejiga, urgencia urinaria o frecuencia, incontinencia urinaria o fecal, estreñimiento	Cateterismo, medicación anticolinérgica, control de fluidos y tiempos, ir al baño con frecuencia, régimen intestinal, modificación de la dieta, laxantes, agentes formadores de masa (laxantes no fuertes)
Problemas sexuales: disminución de la sensibilidad y la libido, sequedad vaginal o disfunción eréctil	Asesoramiento, terapia sexual, medicamentos, dispositivos protésicos, lubricantes
La disfunción cognitiva: pérdida de memoria a corto plazo, disminución de la atención y la concentración, disminución de la función ejecutiva y procesamiento de la información, dificultad para encontrar palabras	Remisión a un neuropsicólogo, terapia ocupacional, terapia del habla para la rehabilitación cognitiva, instrucciones explícitas y simples para realizar tareas
Síntomas secundarios	
Contracturas: disminución del movimiento articular, dolor, dificultades de comunicación	Fisioterapia, dispositivos ortopédicos, medicamentos, derivación a un fisioterapeuta
Inmovilidad: rotura de la piel o úlceras per presión, neumonía	Fisioterapia para el entrenamiento en la transferencia, en casa cuidados a largo plazo, frecuente reposicionamiento
Disfagia, disartria, disfonía: desnutrición, problemas de comunicación	Evaluación de la nutrición, evaluación y tratamiento del habla y la deglución, colocación de una sonda de alimentación, equipos de comunicación aumentativa y alternativa
Cambios respiratorios: dificultad para respirar, problemas de las vías respiratorias, debilidad del músculo respiratorio	Tos y ejercicios de respiración profunda, aspiración según sea necesario, remisión a un neumólogo y fisioterapeuta para el sistema de asientos

Síntomas terciarios	
Problemas psicosociales: trastornos del ánimo como distimia y ansiedad, problemas de pareja, dificultades para afrontar, aislamiento	Derivación a un psiquiatra, psicoterapeuta, o un trabajador social, prescripción de antidepresivos o ansiolíticos
Estrés: dificultad para ejercer el trabajo, tensión en las relaciones interpersonales, dificultades financieras con el aumento de la discapacidad, falta de planificación por avanzado	Asesoramiento, terapias complementarias y alternativas, como las imágenes de biofeedback, guía de masajes, yoga, respiración; derivación al trabajador social para la discusión de la planificación avanzada

TABLA 2. Síntomas y tratamientos comunes en la Esclerosis Múltiple (adaptado de (Brodkey et al., 2011)).

Los síntomas más comunes de carácter físico que se observan en esta patología son la fatiga, la debilidad muscular focalizada, la espasticidad, problemas en la visión, deterioro de la marcha, disfunción del intestino y la vejiga, y molestias sensoriales graves como dolor, adormecimiento o hormigueo (Brodkey et al., 2011). Por otra parte existen cambios a nivel cognitivo como la pérdida de la memoria a corto plazo, y la dificultad en concentrarse o procesar la información. Esta pérdida progresiva de las capacidades físicas, laborales, cognitivas y sociales en el/la paciente ocasiona alteraciones psicológicas graves, que desembocan en depresión clínica, lasitud, ansiedad, insomnio y pérdida del apetito (**Tabla 2**).

2.1.2 Diagnóstico

El diagnóstico en la EM es fundamentalmente clínico. No existen pruebas ni exploraciones complementarias que ofrezcan resultados patognomónicos para la EM. Por lo tanto, el diagnóstico se realiza por la observación repetida de lesiones inflamatorias y desmielinizantes del SNC diseminadas en el tiempo y en el espacio, siempre que se excluyan otras causas o desordenes que pudieran explicar estas lesiones. Así pues, es necesaria la realización de un diagnóstico diferencial que permita descartar otras enfermedades con síntomas parecidos a la EM (Álvarez-Cermeño et al., 2007).

No obstante, existen datos que son característicos (aunque no concluyentes) de la EM, como el incremento del nivel de inmunoglobulinas oligoclonales en el líquido cefalorraquídeo. Por otra parte, la imagen por Resonancia Magnética se ha convertido

en una herramienta muy útil en el hallazgo de lesiones que pueden ayudar en gran medida a un diagnóstico más temprano, importante para establecer tratamientos que modifican el curso de la enfermedad en sus inicios.

Los criterios de diagnóstico consensuados son una herramienta muy útil para el establecimiento de un diagnóstico en aquellas enfermedades que, como la EM, presentan un patrón sintomatológico común a otras etiologías y carecen de pruebas patognomónicas, gracias a la cuantificación del grado de incertidumbre con el que se puede llegar a establecer un diagnóstico para la EM sin necesidad de recurrir a biopsias.

En el 1983 tuvo lugar en Washington la reunión de un comité de expertos, liderados por Charles Poser, en la cual se establecieron una serie de criterios de diagnóstico llamados **Criterios de Poser** (Poser et al., 1983). Estos criterios se basaban en evidencias clínicas y pruebas de laboratorio, y establecían dos grandes categorías para los pacientes con EM: *definida* y *probable*, cada una de las cuales se apoyaba en evidencias clínicas (dos brotes separados en el tiempo y en el espacio) o de laboratorio (análisis de bandas oligoclonales en el líquido cefalorraquídeo).

Aunque la Resonancia Magnética (RM) empezaba a utilizarse en aquella época, esta técnica todavía no estaba suficientemente desarrollada en la clínica. Debido a esto, la RM era considerada una más de las exploraciones complementarias dentro de los Criterios de Poser y no se le otorgó la importancia que tiene hoy en día.

Sin embargo, debido a la aparición de medicamentos capaces de alterar la evolución de la EM en sus etapas más iniciales, se hizo cada vez más necesario la realización de un diagnóstico precoz (Álvarez-Cermeño et al., 2007). Por otra parte, para los pacientes, un diagnóstico temprano permite superar cuanto antes el período inicial de incertidumbre y prepararse psicológicamente para encarar una enfermedad crónica que causará un fuerte impacto en muchos aspectos de su vida personal y profesional.

Así pues en 2001 se hizo una revisión de los Criterios de Poser y se formularon unos nuevos criterios llamados **Criterios de McDonald**, que daban un papel protagonista a la RM para establecer la diseminación espacial y temporal (McDonald et al., 2001). Y

daban mayor importancia a otras exploraciones complementarias como los potenciales evocados visuales (PEV) y el LCR. Estos criterios permitieron simplificar las categorías diagnósticas, así como obtener un diagnóstico más precoz. No obstante, en 2005 volvieron a ser revisados los criterios de McDonald y se acordó dar todo el protagonismo a la RM, para establecer la diseminación temporal de lesiones, permitiendo realizar un diagnóstico más temprano.

Recientemente, el ánimo por acelerar el diagnóstico de la EM permitiendo así empezar el tratamiento cuanto antes y modificar la evolución de la enfermedad, originó que en 2010 se volvieran a reunir un equipo de expertos internacionales, entre los que se encontraban representantes del **CEM-cat** (Centre d'Esclerosis Múltiple de Catalunya), estableciendo los **Criterios de McDonald revisados, 2010** (Polman et al., 2011). Estos nuevos criterios incorporan cambios tan importantes como la posibilidad de realizar un diagnóstico para la EM con tan solo una Resonancia Magnética.

2.1.3. Evolución clínica

Existen diferentes patrones de evolución clínica para la EM (**Figura 5**). Esta enfermedad se caracteriza por la aparición de **brotos**. Según la *Guía oficial para el diagnóstico y tratamiento de la esclerosis múltiple* (Álvarez-Cermeño et al., 2007) del Grupo de Enfermedades Desmielinizantes de la **Sociedad Española de Neurología** ésta es la definición de brote:

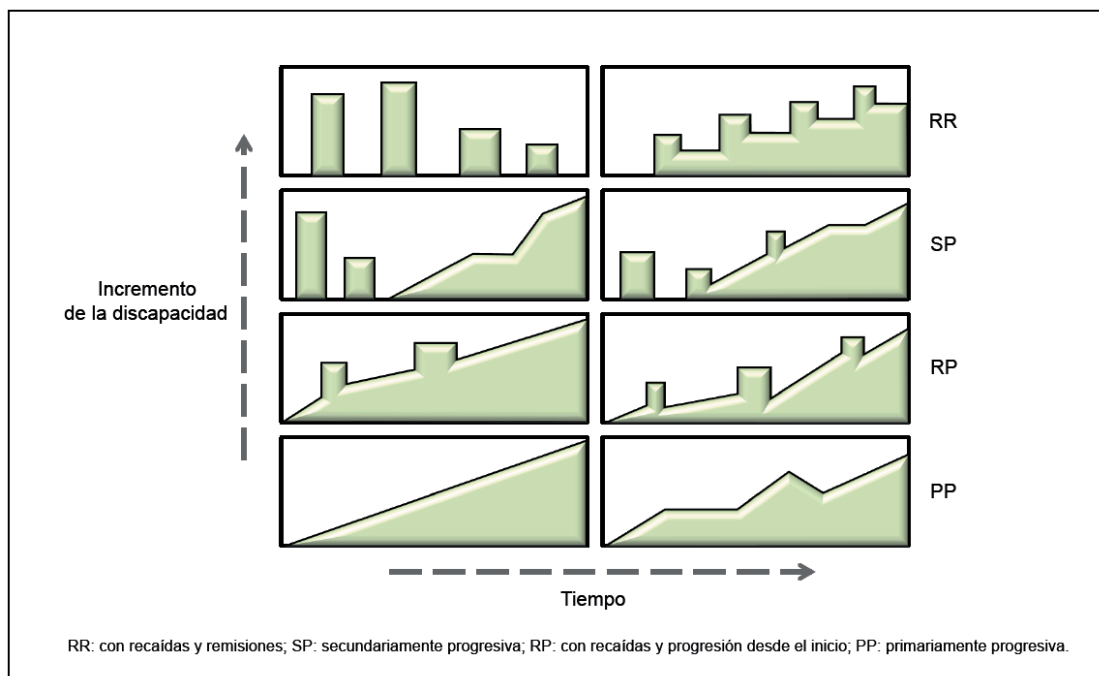
“ Un brote refleja la aparición de nueva actividad inflamatoria focal (aparición de una nueva lesión o reactivación de una ya existente) Se considera brote la aparición de nuevos síntomas o el empeoramiento de alguno previo con una duración superior a 24 horas. Entre brotes sucesivos debe existir al menos un mes de estabilización clínica. Cuando un paciente con una EM-RR presenta una progresión continua de los síntomas durante más de seis meses se considera que su evolución se ha hecho secundariamente progresiva ”

Frecuentemente, en un 80-90% de los casos, la EM se manifiesta en sus inicios con un curso caracterizado por brotes con recuperaciones totales o parciales entre ellos, que a medida que se repiten van dejando secuelas (**recaídas y remisiones, RR**). Este curso de la enfermedad tiene una duración variable, pues a los 10-15 años de enfermedad,

aproximadamente el 50% de estos pacientes cambian a un curso evolutivo progresivo de la enfermedad, denominado **secundariamente progresivo (SP)**.

Aproximadamente el 10-15% de los afectados presentan un curso **primariamente progresivo (PP)**, que se caracteriza por una evolución paulatina de los síntomas sin remisiones claras. Suele iniciarse a edades más tardías (aproximadamente 40-50 años), suele afectar más a hombres y tiene una afectación motora importante.

Menos frecuentemente, los pacientes pueden manifestar un curso de la EM denominado de **recaídas y progresión (RP)**, en el que los síntomas siguen una trayectoria progresiva, marcada por brotes agudos.



CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN DE LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LA EM

Recaídas y remisiones (RR)	Brotos bien definidos, a menudo con recuperación completa o casi completa. Sin progresión de la enfermedad entre ataques.
Recaídas y progresión (RP)	Avance de la enfermedad con recaídas, sin recuperación entre ellas.
Primariamente progresivo (PP)	Empeoramiento continuo de los síntomas neurológicos y deficiencias. Generalmente sin remisión o exacerbaciones agudas.
Secundariamente progresivo (SP)	Agravamiento continuo de los síntomas. Aparece después de una etapa de RR.

FIGURA 5. Patrones de evolución clínica de la EM. Figura adaptada de (Lublin and Reingold, 1996) y tabla realizada a partir de la información extraída de (Álvarez-Cermeño et al., 2007; Brodkey et al., 2011).

2.1.4 Aspectos psicológicos y sociales de la EM

La cronicidad de la EM y su afectación mayoritaria en personas jóvenes, la convierten en una enfermedad que acompañará a los pacientes a lo largo de su vida, afectando gravemente y paulatinamente los aspectos más cotidianos de ésta. En consecuencia, generalmente los pacientes desarrollan cuadros depresivos debidos a la incertidumbre que provoca la evolución de la enfermedad, así como a las complicaciones clínicas, sociales y personales derivadas de ella.

No solamente esto, sino que estudios con RM han puesto de manifiesto que lesiones en las regiones temporales y frontales se correlacionan significativamente en aquellos pacientes de EM con desordenes psicopatológicos tales como depresión, desinhibición, euforia, psicosis y alucinaciones, entre otras (Diaz-Olavarrieta et al., 1999; Feinstein et al., 2004; Haussleiter et al., 2009).

Por todo ello es aconsejable que los pacientes afectados por EM, mantengan su actividad laboral y profesional en la medida de lo posible, ya que ésta no afecta negativamente a la evolución natural de la enfermedad; por el contrario contribuye a que el paciente se sienta más realizado socialmente y evita o retrasa la aparición de desórdenes depresivos (Álvarez-Cermeño et al., 2007).

Por otra parte, debe tenerse en consideración que el curso de la EM, con sus recaídas y remisiones darán lugar a bajas temporales e interrupciones del trabajo, que pueden provocar la aparición de presiones en el ámbito laboral que sometan a los pacientes de EM a situaciones de estrés; haciendo recomendable el apoyo de los servicios sociales a los pacientes.

2.1.5 Epidemiología

La EM afecta aproximadamente a dos millones y medio de personas en todo el mundo, siendo la principal causa de desordenes neurológicos en adultos jóvenes y de mediana edad. Como suele suceder con enfermedades de carácter autoinmune, es dos veces más común en mujeres que en hombres. La aparición de la enfermedad ocurre mayoritariamente entre los 20 y los 50 años, teniendo su pico de aparición cerca de los 30 años.

La incidencia de la EM decrece proporcionalmente con la distancia de los polos, y si bien es cierto que se ha diagnosticado casos de EM en todos los grupos étnicos, se trata de una enfermedad más común entre las poblaciones caucásicas que en poblaciones africanas o asiáticas (Pugliatti et al., 2002).

La etiología de la EM es un enigma aún por resolver. Durante mucho tiempo se ha debatido si la distribución desigual de esta enfermedad en el mundo es debido a factores étnicos (susceptibilidad genética) o bien es debido a diferencias ambientales asociadas a los diferentes territorios (Dean, 1967). La evidencia disponible ha dado paso a la creencia de que ambos son importantes (Ebers, 2008).

Por un lado, existen estudios que han puesto de manifiesto la existencia de casos como el de Cerdeña, donde la prevalencia de la EM es de las más altas del mundo. Históricamente y geográficamente esta isla siempre ha estado muy aislada del resto de Europa, si bien ha sido durante siglos un sitio de paso de viajeros, en sus habitantes siempre ha estado presente una marcada endogamia, preservando así su particular composición genética. Tanto es así que basándonos en distancias genéticas, se considera a Cerdeña la segunda población más diferente del árbol filogenético europeo general, por detrás de los samis, y seguida por vascos e islandeses (Pugliatti et al., 2002). Esta isla es importante para entender que las diferencias genéticas para la EM existen, ya que se ha demostrado que los habitantes del norte (una pequeña población genética y lingüísticamente separada del resto de la región) poseen una incidencia de la EM significativamente menor del resto de la isla de Cerdeña (Sotgiu et al., 2004). Existe por otra parte la hipótesis de que la predisposición a contraer la EM es una alteración genética que tiene su origen en las antiguas poblaciones escandinavas, ya que aquellos países de ascendencia escandinava son los que actualmente poseen mayores índices de prevalencia de la EM (Islandia, Inglaterra, Dinamarca, Canadá, norte de Estados Unidos,...). De hecho, en Australia, la heterogeneidad en la incidencia de la enfermedad entre la población que emigró del norte de Europa y la que migró del sur de Europa sigue siendo patente hoy en día (Pugliatti et al., 2002).

Por otro lado, no debe subestimarse la importancia del ambiente en la aparición de la enfermedad, si bien los estudios anteriores demuestran que existe una predisposición genética a padecer la EM, los estudios con gemelos homocigotos han puesto en relieve una concordancia menor de la esperada. Además, se ha podido observar que los pacientes que emigran de una zona de alta incidencia a una de baja incidencia tienen menor riesgo de desarrollar la enfermedad, pero solo cuando la migración se produce antes del final de la etapa adolescente. Por todo ello, al parecer, es necesario que uno o más agentes inmunológicos, hasta ahora desconocidos, entren en contacto con la persona antes del final de la adolescencia (Pugliatti et al., 2002). La opinión más generalizada es que una infección antes de la edad adulta modifica el sistema inmunológico propiciando la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad años después en aquellas personas genéticamente susceptibles.

2.1.6 Inmunopatología

Actualmente, siguen sin conocerse plenamente los mecanismos mediante los cuales se inicia la EM en humanos, estimulando la transición desde una inmunovigilancia fisiológica a un estado inmunopatológico. Sin embargo, cada día se descubre más acerca de cómo funcionan las células Th17 y como se desarrolla la esclerosis múltiple. Por una parte, las células inmunes activadas expresan VLA-4, una integrina $\alpha 4\beta 7$ que es el ligando de VCAM, expresada en las células endoteliales del SNC. De esta manera, las células Th17 activadas pueden atravesar la barrera hematoencefálica mediante unión a ligando.

Una vez dentro del SNC, la IL23 y el ROR γ t promueven la producción de GM-CSF por las células Th17, el cual aumenta la encefalitogenicidad y la susceptibilidad a desarrollar EAE en ratón. Además GM-CSF promueve la producción de IL23 adicional por las células presentadoras de antígenos (APC), lo que conlleva a la generación de un bucle de retroalimentación que provoca el daño axoglial (Codarri et al., 2011; El-Behi et al., 2011).

A su vez, las citoquinas IL17 e IL22 secretadas por Th17 aumentan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, iniciando una cascada de células Th17 autoreactivas penetrando en el SNC (Kebir et al., 2007), así como células Th1 (secretoras de IFN γ),

células T γ δ , células CD8⁺ citotóxicas, células B y células plasmáticas secretoras de inmunoglobulinas, formando infiltrados perivasculares.

2.1.7 Tratamientos actuales de la EM

En la actualidad la EM no tiene cura. Existen medicamentos que desaceleran parcialmente los síntomas, reduciendo la frecuencia o gravedad de los brotes, sin embargo, ninguno impide el desarrollo de la enfermedad a largo plazo.

Cuando se manifiesta una recaída o brote agudo comúnmente se administra cortisona intravenosa a los pacientes, que ayuda a eliminar la inflamación, pero no afecta al transcurso de la enfermedad. Por otra parte, los tratamientos a largo plazo se han sustentado en el empleo de fármacos inmunomoduladores, como acetato de glatirámico (Copaxone®), mitoxantrona (Novantrone®), IFN- β (Rebif®, Avonex® o Betaseron®) o más recientemente, el uso de Natalizumab (Tysabri®). Sin embargo, estos fármacos solo consiguen reducir con más o menos éxito la frecuencia o la gravedad de los brotes, siendo su efecto sobre el transcurso de la enfermedad a largo plazo una cuestión todavía no resuelta, pues su eficacia es parcial. Además el uso continuado de estos fármacos puede originar efectos secundarios graves.

Los tratamientos basados en el uso de IFN- β tienen una larga trayectoria, pues son de los más utilizados. Se desconoce exactamente el mecanismo de la acción terapéutica que IFN- β tiene en los pacientes de EM, pero su efecto positivo podría estar relacionado con las propiedades anti-inflamatorias de IFN- β , pues inhibe la presentación de antígenos (Arnason, 1996), modulada sobre las células dendríticas (Shapiro et al., 2003) y reduce la expresión de la citoquina pro-inflamatoria IL10 (Zang et al., 2003). No obstante, el tratamiento con IFN- β provoca reacciones inflamatorias diversas.

Por su parte, la mitoxantrona es una droga antineoplásica con propiedades inmunosupresivas que ayuda eficientemente a la estabilización de la EM. No obstante, ostenta una larga lista de efectos secundarios como leucopenia transitoria, flebitis, amenorrea, infertilidad, etc. Sin embargo, los riesgos más serios de este tratamiento es su elevado efecto cardiotóxico, pues afecta gravemente al músculo del corazón, y el

aumento del riesgo de padecer leucemia (Cattaneo et al., 2003; Ghalie et al., 2002; Heesen et al., 2003; Martinelli et al., 2009).

La incorporación posterior de natalizumab a los tratamientos disponibles para la EM supuso una revolución. Este fármaco es un anticuerpo monoclonal contra VLA-4. Cuando el anticuerpo se une a VLA-4 impide la unión entre ésta y VCAM, su ligando, expresado por las células endoteliales del SNC. De este modo, natalizumab inhibe la migración de los linfocitos a través de la barrera hematoencefálica, previniendo la entrada de células T autoreactivas en el SNC (**Figura 6**). Se han observado resultados positivos en algunos estudios realizados con natalizumab en pacientes de EM (Horga and Tintore, 2011; Polman et al., 2006). No obstante, poco después de su aceptación, este fármaco tuvo que ser retirado del mercado por los casos aparecidos de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) (Chaudhuri, 2006; Kleinschmidt-DeMasters and Tyler, 2005; Langer-Gould et al., 2005), pues natalizumab también inhibe la entrada al SNC de células inmunoregulatoras que controlan la enfermedad. La LMP es una enfermedad grave de curso rápido y sin cura.

Más tarde, la revisión exhaustiva de los pacientes tratados con este fármaco determinó que el porcentaje de aparición de LMP era muy bajo (aproximadamente 1,3 casos/1000 pacientes) (Yousry et al., 2006), por lo que el medicamento volvió a ser comercializado y utilizado en pacientes con EM. No obstante, según un informe de la FDA (U.S. Food and Drug Administration, www.fda.gov) desde su reincorporación en junio 2006 hasta mayo de 2010, cuando se realizó el estudio, aproximadamente 66.000 personas en el mundo habían recibido alguna dosis de natalizumab, de las cuales aparecieron 31 casos de LMP, 8 de los cuáles ya habían fallecido debido a la LMP. Esto conlleva a una vigilancia continua de los pacientes con el fin de detectar cuánto antes la aparición de los primeros síntomas de LMP y parar el tratamiento de natalizumab. No obstante, una interrupción repentina del tratamiento provoca una exacerbación de los síntomas de la EM y una grave recaída en el paciente (Wenning et al., 2009).

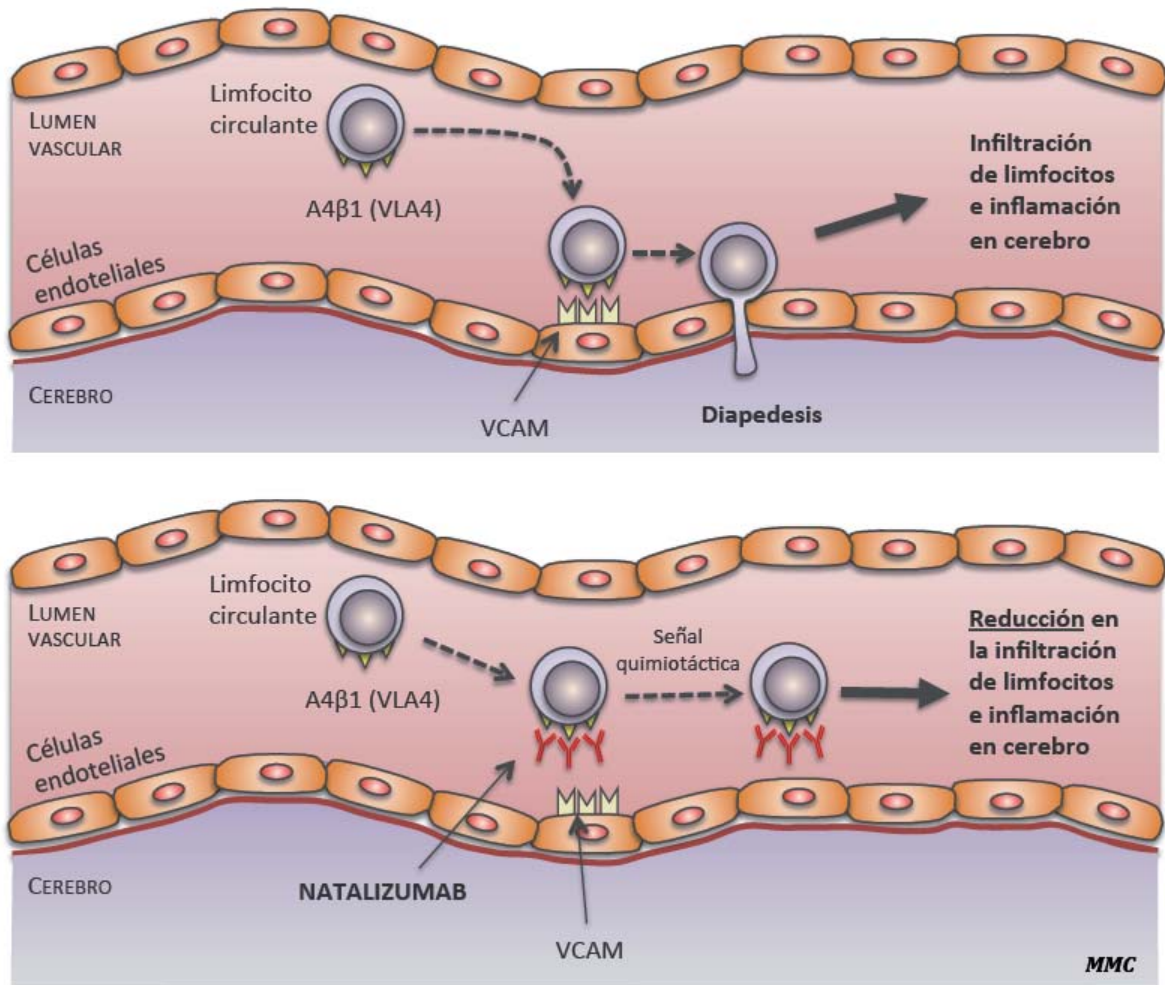


FIGURA 6. Mecanismo de acción de natalizumab (adaptado de (Steinman, 2005))

Además de los fármacos reconocidos, existen tratamientos experimentales para EM. Muchos de estos tratamientos se sustentan en el empleo de anticuerpos o proteínas con potencial inmunomodulador. Algunos ejemplos son adalimumab, infliximab o etanercept, que son inhibidores de $TNF\alpha$. Otros como alemtuzumab, son anticuerpos contra CD52. Los tratamientos basados en el uso de anticuerpos suelen ocasionar efectos secundarios graves, ya que inhiben respuesta inmunes no específicas de Th17. Un ejemplo claro de ello es el caso de Ustekinumab, un fármaco basado en el uso de anticuerpos monoclonales contra la subunidad común de IL12 e IL23, la p-40. Este tratamiento no solo inhibe IL23, sino también IL12 (**Figura 7**), provocando un bloqueo de la respuesta Th1, y por tanto un aumento del riesgo de infecciones y la aparición de tumores.

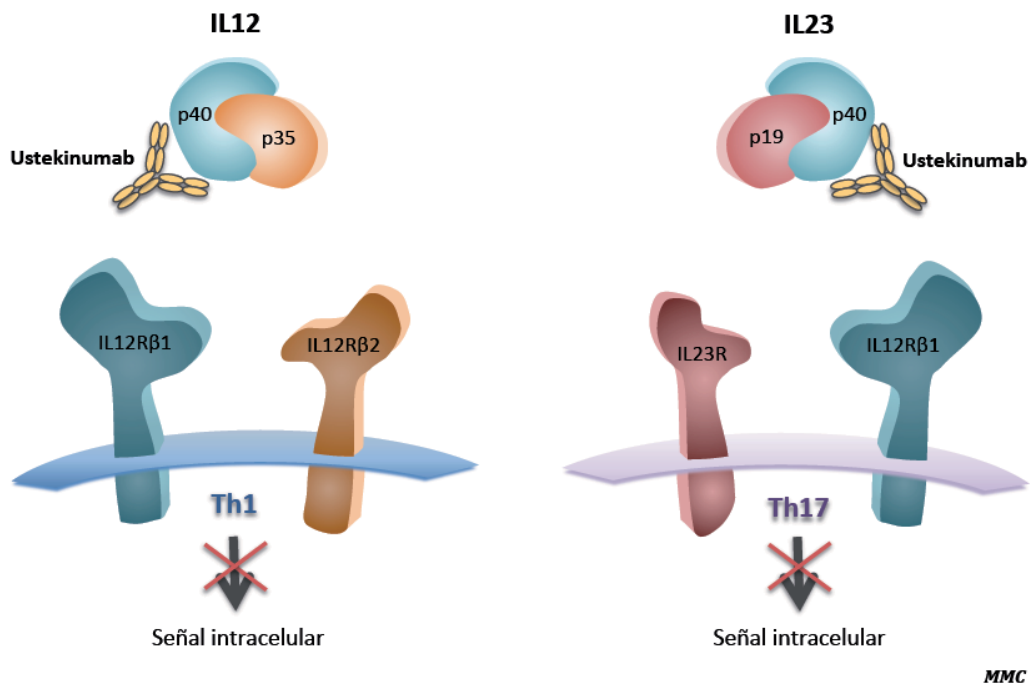


FIGURA 7. Mecanismo de acción de Ustekinumab, inhibiendo IL12 e IL23 (adaptado de (Schmidt, 2008))

2.1.8. Encefalomiелitis Experimental Autoimmune

La Encefalomiелitis Experimental Autoimmune (EAE) es el modelo más antiguo y el más comúnmente utilizado para el estudio de la EM debido a que comparte muchas de las características clínicas, histológicas y patogénicas, siendo el modelo que mejor reproduce esta enfermedad (Lassmann and Wisniewski, 1979; Wekerle et al., 1994).

Sin embargo, la EAE no es tan solo un modelo de enfermedad, sino más bien una familia de modelos, consistentes en una inflamación del SNC tras la inmunización con un antígeno específico de CNS, en aquellas especies susceptibles.

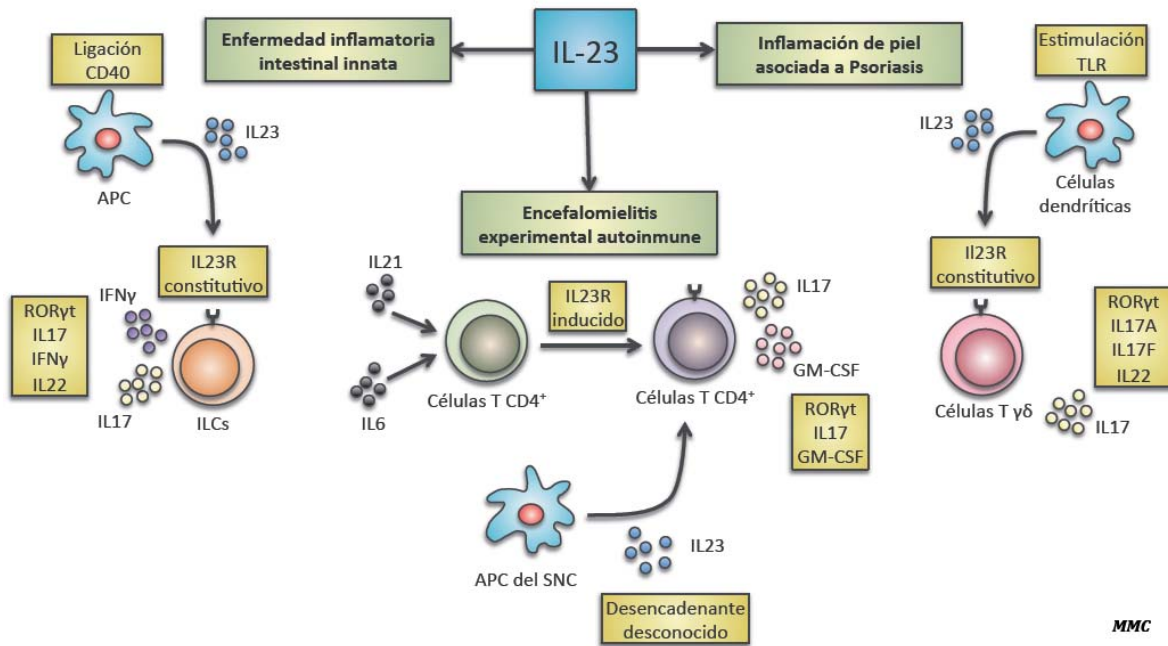
No todas las especies ni todas las cepas son susceptibles de desarrollar EAE. Para su inducción pueden utilizarse varios animales como ratas, cobayas o primates no-humanos. Sin embargo, los animales más utilizados son los ratones, especialmente la cepa C57BL/6J, mediante inmunización con MOG (glicoproteína miélica de los oligodendrocitos), que induce la enfermedad en su curso progresivo y no remitente. Por otro lado, inmunizando la cepa SJL/J, mediante inmunización con la proteína PLP, se consigue un modelo de EAE con un curso remitente-recurrente. Así pues, la

combinación de especies, cepas y antígenos encefalitogénicos dan lugar a una gran variedad en el modelo animal de EAE.

Los ratones C57BL/6J inmunizados con MOG, junto con un adyuvante como CFA (*Complete Freund's Adjuvant*) y toxina pertussis, desarrollan generalmente una forma crónica de EAE, caracterizada por la inflamación del SNC, desmielinización y daño en neuronas y oligodendrocitos, alrededor de las dos semanas post-inmunización. Así, algunos de los tratamientos actuales aprobados para su uso en pacientes de EM, como mitoxantrona, natalizumab, acetato de glatirámico o fingolimod, tuvieron estudios preclínicos con ratones EAE (Constantinescu et al., 2011). No obstante, también es cierto que algunos fármacos, como el TNF α , que tuvo un efecto positivo en este modelo, posteriormente tuvo un efecto adverso en humanos (Baxter, 2007).

Por otra parte, en los pacientes de EM, los niveles de IL17 (mRNA y proteína) se encuentran elevados en sangre y en células mononucleadas aisladas del líquido cefalorraquídeo (Lock et al., 2002; Matusevicius et al., 1999). Asimismo, los ratones EAE presentan un incremento en IL17 (**Figura 8**) (Zhang et al., 2003). Además, la EAE no se desarrolla en aquellos ratones deficientes para IL17 (Komiyama et al., 2006). Estas observaciones sugieren que, al igual que en la enfermedad humana, IL17 y por tanto la vía Th17, juegan un papel importante en el modelo de enfermedad EAE (Becher and Segal, 2011; Komiyama et al., 2006).

La principal limitación de la EAE es la hipersensibilidad que los animales desarrollan a los estímulos externos, ocasionando que estos animales deban ser estabulados en un ambiente estéril, pues muestran una hiperreactividad a infecciones oportunistas. Por otra parte, no solo la cepa o el antígeno determinan el curso de la enfermedad, sino que incluso dependiendo de la compañía que provee los animales es posible observar diferencias, especialmente en el momento del establecimiento de los primeros síntomas.



MMC

FIGURA 8. Funciones divergentes pero solapadas de IL23 en diferentes modelos de autoinmunidad. Ha sido demostrado que IL23 juega un papel esencial en diferentes modelos de autoinmunidad, como la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) o la psoriasis. Cabe señalar que IL23 no sólo actúa sobre las células T $\alpha\beta$ convencionales, sino también en células innatas tales como células T $\gamma\delta$ y células innatas linfoides (ILC), con efectos parcialmente similares en los tres tipos celulares, como la inducción de la secreción de IL17 y la estabilización de la expresión ROR γ t. Sin embargo, mientras que la participación de cualquiera de estos tipos celulares en las enfermedades autoinmunes descritas ha sido demostrada en modelos animales, su contribución en la progresión de la enfermedad en humanos queda aún por determinar. Figura adaptada de (Croxford et al., 2012)

2.2 Enfermedad de Crohn (EC)

La enfermedad de Crohn (EC), junto con la Colitis Ulcerosa, es uno de los desordenes más representativos de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal, término que engloba aquellas enfermedades que cursan con una inflamación del tubo digestivo no-específica o idiopática (Riera, 2002). La incidencia de esta enfermedad ha aumentado considerablemente en las últimas décadas, afectando principalmente a los países más desarrollados (10-15 casos/100.000/año). Además afecta a personas jóvenes, ya que la mayor parte manifiestan los primeros síntomas de la enfermedad entre los 15 y los 40 años (Saro and Ruiz, 2002).

La EC se caracteriza por ser una enfermedad autoinmune, multigénica y multifactorial, que puede afectar a cualquier región del tracto digestivo, aunque normalmente las regiones que se encuentran más afectadas son el colon y el íleo. Esta enfermedad se considera de baja mortalidad, sin embargo su morbilidad es elevada. Alterna períodos de remisión clínica con fases de actividad sintomática, llamados brotes, en la que los pacientes pueden tener diarrea, a menudo con sangre, dolor abdominal, aparición de fístulas, ulceraciones, obstrucción intestinal y otros síntomas de carácter sistémico como fiebre, fatiga o pérdida de peso, además del riesgo de otras complicaciones como la aparición de cáncer colorrectal (Riera, 2002).

La etiología de esta enfermedad es desconocida, aunque se cree que un factor iniciador, como un agente microbiano, provocaría una reacción inflamatoria grave, prolongada e inapropiada en personas predispuestas genéticamente (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001). Todo indica que las células de la mucosa intestinal pierden su tolerancia hacia la microflora bacteriana luminal y varios antígenos que circulan por el tubo digestivo, provocando una gran producción de citoquinas proinflamatorias de forma local y manteniendo sus niveles excesivamente altos. Esta respuesta inflamatoria se perpetuaría en el tiempo, cronificando la enfermedad (Riera, 2002).

Al igual que otras enfermedades autoinmunes, en la EC juega un papel muy importante la vía del Th17. Se han realizado estudios GWAS (Genome-Wide Association Study) con el fin de estudiar los factores genéticos predisponentes de esta enfermedad, concluyendo que el gen de IL23R se encuentra significativamente asociado a la enfermedad de Crohn, pues variaciones no comunes de este gen confieren protección contra la EC (Duerr et al., 2006), sugiriendo de esta manera que esta vía de señalización es una diana terapéutica a tener en cuenta para el tratamiento de EC.

3. TERAPIA GÉNICA

3.1. Descripción

Citando a la *American Society of Gene and Cell Therapy*, la Terapia Génica se define como:



The introduction or alteration of genetic material within a cell or organism with the intention of curing or treating a disease.



La idea de tratar enfermedades humanas mediante la transferencia de un gen terapéutico apareció por primera vez a principios de la década de 1970 (Friedmann and Roblin, 1972), dos avances científicos que fueron adquiriendo forma durante aquella época fueron los principales responsables. En primer lugar, la comunidad científica vivió un crecimiento exponencial del conocimiento de la función de los genes humanos, así como del impacto que mutaciones en estos genes son capaces de causar. En segundo lugar, hubo un desarrollo progresivo e incesante de la tecnología del DNA, con técnicas cada vez más efectivas para la transferencia de cadenas de DNA en células de mamíferos (Couzin-Frankel, 2009). Más adelante, el secuenciado completo del genoma humano (Lander et al., 2001; Stein, 2004; Venter et al., 2001) y la percepción de que muchas enfermedades tienen una base genética, no hizo más que agilizar el desarrollo de estrategias de terapia génica.

Ciertamente, utilizando una vía de administración convenientemente escogida y un vector con tropismo específico para el órgano o el tejido afectados es posible obtener un tratamiento local y dirigido. Como resultado, la aparición de efectos secundarios disminuye considerablemente. Más aún, introduciendo el gen y no la proteína recombinante, el efecto terapéutico tiene una duración más larga y no es necesaria una administración continua, como la de los tratamientos actuales.

Dicho de otra manera, para que una estrategia de terapia génica sea eficaz, es necesario identificar correctamente cual es el gen terapéutico adecuado, cual es el

tejido o las células diana de interés, y encontrar un vector que sea capaz de liberar eficientemente este gen en el lugar deseado.

Si bien en sus inicios la terapia génica fue concebida como estrategia para el reemplazo génico en aquellas enfermedades causadas por la deficiencia heredada en un gen (enfermedades monogénicas); hoy en día los ensayos clínicos destinados al tratamiento de este tipo de enfermedades apenas pasan del 8% (**Figura 9**). Por el contrario, la gran mayoría de ensayos clínicos se han dirigido a curar el cáncer, con más del 64% de los ensayos clínicos (Ginn et al., 2013). De manera que el concepto de transferencia génica está siendo aplicado a propósitos muy variados siendo los más comunes los estudios funcionales de genes (Kanwar et al., 2011; Kurth et al., 2012; Mac Gabhann et al., 2010), la corrección de defectos génicos, la expresión de proteínas terapéuticas, y la inmunización contra tumores y agentes infecciosos (Edelstein et al., 2007; Rollier et al., 2011).

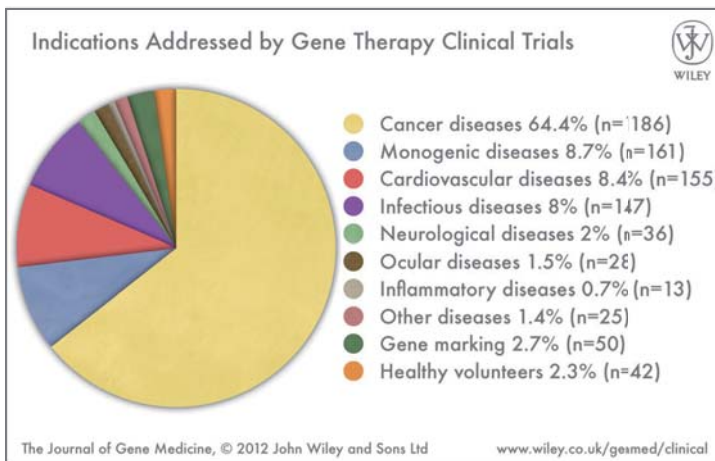


FIGURA 9. Ensayos clínicos y enfermedades a las que van dirigidos (Ginn et al., 2013)

3.2. Vectores virales

Los vectores de terapia génica son los responsables de la transferencia del material genético. No es de extrañar que ya desde los comienzos se considerara el gran potencial de los virus para desempeñar esta función. Considerados desde un punto de vista elemental, las partículas víricas son compuestos de ácido nucleico, protegido de

su degradación por el medio extracelular gracias a un conjunto de proteínas que a su vez le ayudan a su internalización celular.

Los vectores se dividen básicamente en dos tipos: virales y no virales. Los vectores virales son mucho más eficientes que los no virales en la transferencia del gen a las células diana, pero aportan otros problemas como la inmunogenicidad. En la siguiente tabla se muestran las características de los vectores virales más utilizados en la terapia génica:

Vector	Material genético	Capacidad de empaquetamiento	Tropismo	Potencial inflamatorio	Forma del genoma viral en la célula	Principales limitaciones	Principales ventajas
Con envuelta							
Retrovirus	RNA	8 kb	Células en división	Bajo	Integrado	Solo transduce células en división; la integración puede inducir oncogénesis en algunas aplicaciones	Transferencia génica persistente en células en división
Lentivirus	RNA	8 kb	Amplio	Bajo	Integrado	Integración puede inducir oncogénesis en algunas aplicaciones	Transferencia génica persistente en muchos tejidos
HSV-1	dsDNA	40 kb* 150 kb [‡]	Fuerte por neuronas	Alto	Episomal	Inflamatorio; expresión del transgen transitoria en células no neuronales	Capacidad de empaquetamiento grande; fuerte tropismo por neuronas
Sin envuelta							
AAV	ssDNA	<5 kb	Amplio, con la posible excepción de células hematopoyéticas	Bajo	Episomal (>90%) Integrado (<10%)	Capacidad de empaquetamiento baja	no-inflamatorios; no-patogénicos
Adenovirus	dsDNA	8 kb* 30 kb [§]	Amplio	Alto	Episomal	Potente respuesta inflamatoria mediada por la cápside	Transducción de muchos tejidos extremadamente eficiente

TABLA 3. Clasificación y características más importantes de los vectores virales de terapia génica más utilizados. Tabla adaptada de (Thomas et al., 2003). *Defectivo en replicación. [‡]Amplicon. [§]Helper dependent. AAV: Vector viral adenoasociado, dsDNA: DNA de doble cadena, HSV-1: Herpes Simple Virus-1, ssDNA: DNA de cadena única.

3.2.1 El vector ideal

Volviendo al argumento expuesto con anterioridad, la correcta elección del vector es fundamental para que una estrategia de terapia génica tenga éxito. Determinar qué características debe tener un vector para que sea efectivo en el tratamiento de una enfermedad es el primer paso para evaluar su potencial. Como es evidente, las características priorizadas dependerán de la estrategia en sí, y la diversidad de vectores no hace más que favorecer la probabilidad de encontrar aquél idóneo. Sin embargo, existen características básicas y comunes que un vector “ideal” debe poseer.

En primer lugar, debe tener un tropismo lo más específico posible, con el fin de aumentar la transducción en el tejido diana y a la vez minimizar la transducción en las células, órganos o tejidos no-diana.

En segundo lugar, debe expresar el transgen durante un largo período temporal, además de alcanzar niveles terapéuticos; dado que una expresión baja del transgen apenas manifestaría ningún efecto. Sin embargo, una expresión demasiado alta del transgen podría provocar una respuesta inmune, llegando a tener un efecto citotóxico.

Por otro lado, los efectos secundarios provocados por la administración del vector deben ser mínimos, y por supuesto, las patologías asociadas a la infección por el virus deben estar absolutamente suprimidas, generalmente impidiendo su reproducción dentro de la célula por delección de genes necesarios para su replicación. Por todo, la respuesta inmune debida a la presencia del vector *per se*, debe ser lo más baja posible.

Por último, es importante que el método de producción del vector viral sea escalable, es decir que sea posible producir cantidades suficientes del vector y de alta pureza para su uso futuro en pacientes.

3.2.2 Virus adenoasociados (AAVs)

Los virus adenoasociados (AAV) pertenecen a la familia *Parvoviridae*, donde se encuentran los virus de DNA más pequeños que infectan animales. Con un diámetro de aproximadamente 25nm, están compuestos por una cápside proteica que envuelve el genoma viral, formado por una cadena simple de DNA (Cassinotti et al., 1988; Rose et

al., 1971; Srivastava et al., 1983; Xie et al., 2002). Aunque es muy común en humanos encontrar infecciones latentes de AAV, todavía no se ha asociado ninguna patogénesis a estos vectores (Bessis et al., 2004).

Del género *Dependovirus*, estos virus no son autónomos, sino que requieren de una co-infección con un virus *helper* para replicarse (Atchison et al., 1965). En un principio se pensó que los AAV eran exclusivamente dependientes de adenovirus (Atchison et al., 1965), de ahí el nombre, pero más tarde se observó que otros virus, tales como *herpes simplex virus* (Georg-Fries et al., 1984), *vaccinia virus* (Schlehofer et al., 1986) y *human papillomavirus* (Ogston et al., 2000; Walz et al., 1997) también podían actuar permitiendo la replicación de los AAV.

Con respecto a los AAV wt, en ausencia de un virus *helper*, el genoma viral puede persistir en la célula de forma episomal o bien integrarse en el genoma celular (Cheung et al., 1980; Kotin et al., 1990; Samulski et al., 1991). Después de una infección por un virus *helper*, la transcripción puede continuar y el AAV acabar su ciclo replicativo.

En ausencia de virus *helper*, en condiciones no permisivas, lo más frecuente es que el genoma viral persista de forma latente en el núcleo celular como episoma, ya sea como monómero o multímero, en forma lineal o circular (Duan et al., 1998; Schnepf et al., 2005). Mucho menos frecuente es que se dé la posibilidad de una integración en el genoma de la célula huésped. En este último caso, la integración es específica de sitio, y en humanos se da en el brazo *q* del cromosoma 19 (McCarty et al., 2004). En referencia a los vectores derivados de AAV, la delección del gen *Rep 78/68* ocasiona la pérdida de esta capacidad de integración específica (Smith, 2008). Aún así estos vectores originan una infección larga y estable del transgen, gracias a su bajo perfil inmunogénico. En efecto, se ha descrito una expresión del transgen superior a 6 meses en SNC de ratón (Klein et al., 1999), y en otros tejidos, por más de 6 años en primates y más de 8 años en perros (Niemeyer et al., 2009; Rivera et al., 2005; Stieger et al., 2009).

El genoma de los AAV wild-type está formado por dos genes que codifican para 4 proteínas de replicación (*Rep*), 3 proteínas de la cápside (*Cap*) y una proteína activadora de empaquetamiento. Éste se halla flanqueado por dos secuencias

invertidas repetidas llamadas *inverted terminal repeats*, o *ITR*, de 145 pb cada una (Lusby et al., 1980; Sonntag et al., 2010; Srivastava et al., 1983). Dada la complementariedad en su secuencia, las *ITR* tienen una estructura de bucle en forma de T, y funcionan como origen de replicación genómica (Lusby et al., 1980; Nash et al., 2008; Straus et al., 1976; Tattersall and Ward, 1976).

Las proteínas *Rep* son necesarias en la replicación del genoma y en el empaquetamiento de éste dentro de los viriones formados (Im and Muzyczka, 1990, 1992; Snyder et al., 1990). Las más grandes, llamadas *Rep 78* y *Rep 68*, reciben sus nombres de sus pesos moleculares, y realizan múltiples funciones, siendo importantes en todos los aspectos del ciclo reproductivo de los AAV, tales como la transcripción y la replicación del DNA. Además son las responsables de la integración del genoma viral en la célula huésped que sucede en los AAV wt. Las proteínas *Rep* más pequeñas, llamadas *Rep 40* y *Rep 52*, son importantes para el empaquetamiento del DNA dentro de la cápside preformada (King et al., 2001).

En referencia a las proteínas *Cap*, son las responsables de formar la cápside de los AAV, y se han denominado VP1, VP2 y VP3. Las cápsides de 8 serotipos de AAV han sido caracterizadas completamente: AAV1 (Miller et al., 2006), AAV2 (Kronenberg et al., 2001; Xie et al., 2002), AAV 4 (Kaludov et al., 2003), AAV5 (Walters et al., 2004), AAV6 (Xie et al., 2008), AAV7 (Quesada et al., 2007), AAV8 (Nam et al., 2007) y AAV9 (Mitchell et al., 2009). Los estudios revelan que suelen estar formadas por 50 copias de VP3, 10 de VP2 y 10 de VP1 (Kronenberg et al., 2001), aunque estos ratios pueden variar. Estas proteínas facilitan la unión entre el virión y el receptor de la superficie celular, que varía entre los diferentes serotipos. Por ejemplo, el receptor primario de unión a la célula de AAV2 es heparin sulfato, en cambio otros serotipos como el AAV1, AAV4, AAV5 y AAV6 utilizan el ácido siálico como receptor (Kaludov et al., 2001; Wu et al., 2006b). En cuanto a AAV8, éste utiliza el receptor de laminina (Akache et al., 2006), y el AAV9 el N-linked galactose (Shen et al., 2011).

La entrada en la célula se origina vía fagocitosis, a través de endocitosis mediada por receptor (Bartlett et al., 2000). En el interior celular, los viriones se liberan del endosoma gracias al dominio fosfolipasa presente en VP1, y llegan hasta el núcleo por

la existencia de señales de localización nuclear en los extremos de VP1 y VP2 (Grieger et al., 2007; Rabinowitz and Samulski, 2000). Una vez dentro del núcleo las cápsides son disgregadas y el genoma liberado (Johnson and Samulski, 2009). A continuación, los genes *Rep* víricos y la maquinaria de síntesis de DNA celular convierten el DNA viral en doble cadena (Ferrari et al., 1996).

Inicialmente, para producir AAV se llevaba a cabo una coinfección de las células productoras con Ad, este sistema generaba buenas producciones de AAV, pero desafortunadamente, también generaba una gran cantidad de partículas adenovirales. Una mejora sustancial en la capacidad de producción de AAV en el laboratorio se produjo cuando se implantó el sistema de la **triple transfección de plásmido** (Xiao et al., 1998).

En primer lugar, cabe destacar que el único elemento necesario en *cis* para la replicación, la integración y el empaquetamiento del DNA en los AAV son las secuencias *ITR*. Por lo tanto, se empieza generando un plásmido vector DNA donde los genes que codifican para las proteínas *Rep* y *Cap* se han eliminado, y en lugar de estos se ha clonado un cassette de expresión que contiene el gen terapéutico o *reporter* deseado, precedido por un promotor, y seguido de una secuencia de poliA. Por otro lado, los genes *Rep* y *Cap* específicos de un serotipo son expresados en *trans* a partir de una plásmido diferente, carente de ITRs. Y por último, el adenovirus es sustituido por un plásmido que contiene los genes adenovirales necesarios para la reproducción del vector, E1a, E1b, E2a, E4orf6 y VA (Allen et al., 2000; Xiao et al., 1998).

A la ya comentada ausencia de partículas adenovirales contaminantes en las producciones de AAV, se sumaron otras ventajas aportadas por el sistema de la triple transfección en células HEK293, convirtiéndose en uno de los sistemas de producción más extendidos para AAV. Así, por ejemplo, se observó que con una mutación en el codón de inicio de Rep78 (ATG→ACG), disminuía la expresión de *Rep*, aumentaban los niveles de producción de *Cap*, y por consiguiente se conseguían producciones por célula de 5 a 10 veces más eficientes (Li et al., 1997). Sin embargo, la mejora más importante aportada por este método de producción fue el desarrollo del fenómeno conocido como Cross-packaging.

El Cross-packaging permite que un vector DNA basado en el genoma de AAV2 (el serotipo más estudiado y caracterizado), con las ITR del serotipo 2 pueda trans-encapsidarse con las cápsides de otros serotipos de AAV (Rabinowitz et al., 2002), formando los llamados pseudotipos de AAV. Esto se consigue utilizando un plásmido *Rep/cap*, en el que se sustituye el *cap* del 2 por el de otro serotipo. Gracias a este sistema se pueden hacer comparaciones directas *in vivo* del tropismo en modelos animales (Rabinowitz et al., 2002; Zincarelli et al., 2008). Además se puede evitar la posible complicación asociada a inmunidad pre-existente contra el AAV2 (Taymans et al., 2007; Van der Perren et al., 2011; Vandenberghe et al., 2006).

A pesar del éxito emergente de estos vectores, cabe mencionar que también existen algunas desventajas. Quizá la más destacable sea su limitada capacidad de clonación, no apto para muchos genes terapéuticos, ya que no es posible exceder los 4,7 kb de capacidad de encapsidación (Dong et al., 2010; Dong et al., 1996; Hirsch et al., 2010; Lai et al., 2010; Wu et al., 2010). Por otra parte, como se ha comentado anteriormente, los AAV requieren que su genoma sea convertido de DNA de cadena simple a cadena doble antes de que se inicie la expresión del transgen, provocando que sean particularmente lentos (Coura Rdos and Nardi, 2007).

No obstante, una de sus mejores ventajas es el extenso tropismo que abarcan los diferentes serotipos de AAV. Continuamente se publican artículos para tratar de esclarecer el tropismo según las diferentes vías de administración y los modelos animales, ya que parece ser que varía considerablemente entre las cápsides de los diferentes serotipos (Chao et al., 2000; Rabinowitz et al., 2002; Wu et al., 2006a; Xiao et al., 1999). A modo de ejemplo, AAV1 y AAV6 transducen con relativa eficiencia músculo esquelético (Hauck and Xiao, 2003), mientras que AAV9 transduce músculo muy eficiente, y también miocardio, gracias a su capacidad para atravesar la barrera endotelial de los vasos (Ortolano et al., 2012). AAV8 es un excelente vector para la infección de hígado (Ortolano et al., 2012), además de ser capaz de transducir el páncreas exocrino y endocrino (Cheng et al., 2007; Jimenez et al., 2011). Y los serotipos AAV5, AAV7 y AAV8 infectan eficientemente los fotoreceptores de la retina, mientras que AAV5 y AAV4 infectan el epitelio pigmentado de ésta (Weber et al., 2003). El serotipo 5 además también infecta el epitelio respiratorio (Ortolano et al., 2012). En

cuanto a sistema nervioso central, aunque no se considera su sitio natural de infección, los AAV transducen varios tipos celulares diferentes, dependiendo del pseudotipo. Mientras las neuronas son transducidas eficientemente por la mayoría de pseudotipos; los astrocitos, células gliales y endocitales son infectadas selectivamente por algunos pseudotipos de AAV (Alisky et al., 2000; Broekman et al., 2006; Burger et al., 2004; Davidson et al., 2000; Kaplitt et al., 1994; Lawlor et al., 2009; Van der Perren et al., 2011; Van Vliet et al., 2008; Wang et al., 2003). Es destacable comentar que el pseudotipo 9 puede cruzar la barrera hematoencefálica tras su administración intravenosa (Duque et al., 2009; Foust and Kaspar, 2009; Foust et al., 2009; Gray et al., 2011).

3.2.3. Adenovirus

Los adenovirus se encuentran entre los vectores virales más utilizados en terapia génica, vacunación y oncolisis (**Figura 10**). Especialmente, el Adenovirus 5 es el vector viral más común en los ensayos clínicos, dado que ha sido objeto de un gran estudio y caracterización, además de haberse observado que posee un perfil de seguridad superior a otros serotipos tras su aplicación sistémica (Stone et al., 2007).

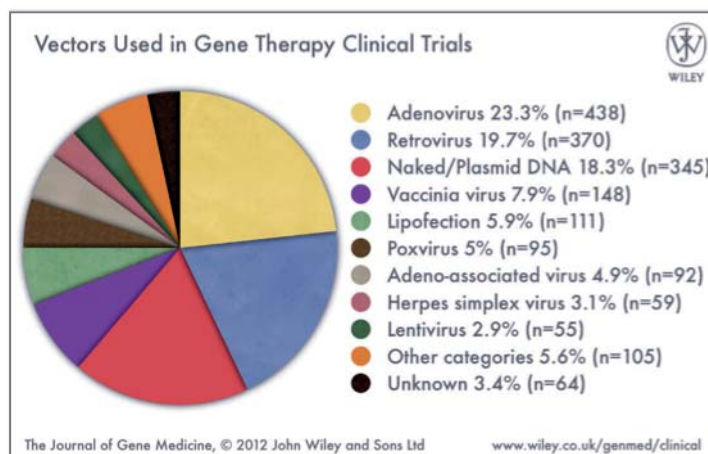


FIGURA 10. Vectores utilizados en ensayos clínicos de terapia génica (Ginn et al., 2013).

Pertenecientes a la familia *Adenoviridae*, están formados por una cápside desprovista de envuelta externa de un diámetro aproximado de 70-100 nm, que alberga en su interior un genoma formado por una doble cadena lineal de DNA de 34-48 kilobases

(kb) (Benko and Harrach, 2003; Davison et al., 2003; Russell, 2000; Stone et al., 2007). Dicho brevemente, las partículas víricas consisten en una cápside icosaédrica formada por proteínas, con un núcleo que contiene el material genómico del virus (Reddy et al., 2010).

En términos evolutivos cabe resaltar el éxito de estos vectores, debido a su capacidad para infectar una gran variedad de animales, tales como mamíferos, peces, pájaros, anfibios y reptiles (Benko and Harrach, 2003; Davison et al., 2003). Además, estos patógenos son también muy comunes en humanos, originando una enfermedad leve y autolimitada en adultos inmunocompetentes. En cambio, la infección en niños o adultos inmunosuprimidos provoca una enfermedad aguda e incluso crónica (Kojaoghlanian et al., 2003).

Hasta la fecha, más de 100 serotipos diferentes han sido descritos, de los cuales al menos 52 han sido reconocidos como adenovirus humanos (HAd). Históricamente, los serotipos de HAd se han clasificado en 6 grupos o especies (A-F), basándose en sus propiedades de hemaglutinación y su organización/homología genómica (Benko and Harrach, 2003; De Jong et al., 1999; Stone et al., 2007). Además la especie o grupo B se divide en 2 subespecies o subgrupos (B1 y B2), dado que difieren en su tropismo y presentan un patrón de enzimas de restricción diferente (Segerman et al., 2003; Wadell et al., 1980). En 2007 un nuevo serotipo de adenovirus humano fue descrito a partir del estudio de unos pacientes con diarrea en EEUU, este serotipo fue clasificado como Adenovirus 52 (Ad52). Fue precisa la creación de un nuevo grupo o especie, llamado G, para este nuevo adenovirus, debido al análisis filogenético de los genes homólogos y su genoma (Banyai et al., 2009; Jones et al., 2007).

El tropismo y las manifestaciones clínicas observados tras la infección por un HAd son diferentes dependiendo de la especie o subespecie (**Tabla 6**). Por ejemplo, los grupos D y E provocan infecciones de tipo ocular. En cambio, los grupos B1, C y E, están relacionados con infecciones del tracto respiratorio. Por otro lado, los grupos A y F conducen a infecciones gastrointestinales; mientras que el subgrupo B2, está más relacionado con infecciones del tracto renal y urinario. Por último, el recientemente

formado subgrupo G, está considerado uno de los causantes de la gastroenteritis aguda en niños (Banyai et al., 2009; Jones et al., 2007).

Subgrupos de HAd	Serotipos	Tropismo natural predominante	Receptores conocidos
A	12, 18, 31	gastrointestinal	CAR
B1	3, 7, 16, 21, 50	respiratorio	CD46, CD80/86, Receptor X, HSPG
B2	11, 14, 34, 35	renal	CD46, CD80/86, Receptor X, HSPG
C	1, 2, 5, 6	respiratorio	CAR, HSPG, MHC-I, VCAM-I, Integrinas
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51	ocular	CAR, ácido sialico, CD46
E	4	respiratorio, ocular	CAR
F	40, 41	gastrointestinal	CAR
G	52	gastrointestinal	-----

TABLA 4. Subgrupos de HAd y principales características.

La diversidad en el tropismo existente entre los diferentes serotipos de HAd favorece a la terapia génica, pues posibilita la selección de diferentes serotipos para cada estrategia terapéutica, es decir, aquél que infecte de la forma más específica posible las células o tejidos de interés. Desafortunadamente, no todos los serotipos pueden producirse con la misma eficiencia *in vitro*. Por ejemplo, mientras la producción de Ad5 es rápida y eficiente, la producción de los adenovirus del grupo F, como el Ad40, es larga, costosa y con muy baja eficiencia.

El tropismo de los adenovirus viene determinado por las proteínas que conforman su cápside, en concreto por las proteínas *fiber*. La cápside de los adenovirus está formada por al menos nueve tipos de proteínas. Básicamente se dividen en proteínas mayores (*Hexon* o proteína II, *Penton Base* o proteína III, y el *Fiber* o proteína IV), y proteínas menores (IIIa, VI y IX). El número otorgado a cada proteína tiene una razón histórica y se debe a la diferente movilidad de las partículas de Ad2 purificadas en un gel SDS-acrilamida. Además, existen otras proteínas (V, VII, μ , y *TP*) que son empaquetadas

junto con el DNA en el núcleo del virus (Chatterjee et al., 1985; Everitt et al., 1973; van Oostrum and Burnett, 1985). Las partículas adenovirales forman un icosaedro, en los vértices del cual se sitúan los capsómeros llamados *penton*, a los cuales se encuentran sujetos los *fibers*. Las proteínas *hexon* se agrupan formando trímeros y forman el resto de la cápside (**Figura 11**).

El reconocimiento inicial de las partículas víricas con la superficie celular se da por la unión del *fiber* con el receptor de coxsackievirus B y adenovirus (CAR) (Bergelson et al., 1997; Henry et al., 1994; Louis et al., 1994; Tomko et al., 1997). Este receptor se encuentra presente en muchos tejidos y órganos como el cerebro, los pulmones, el corazón o el hígado. Una vez se ha dado esta unión inicial, el motivo RGD presente en el *penton base* interacciona con las integrinas celulares de la familia de las α_v integrinas. Esta interacción provoca la internalización del adenovirus por endocitosis mediada por receptor y dependiente de clatrina. Una vez los viriones se encuentran dentro del citoplasma, son conducidos a través de los microtúbulos por acción de la dineína hasta el núcleo, donde entra por medio del complejo de poro nuclear el genoma desnudo.

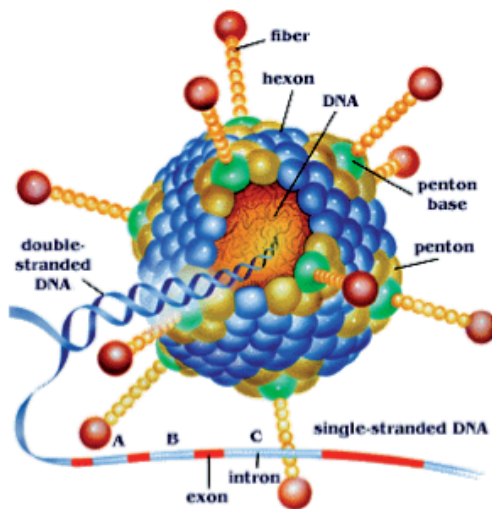


FIGURA 11. Esquema representativo de un Adenovirus (Martin et al., 2007).

Se conoce que la proteína *hexon*, la más grande de las proteínas mayores, es el componente más antigénico de la cápside adenoviral (Bradley et al., 2012; Gall et al., 1996; Wu et al., 2002). Sin embargo, algunas publicaciones muestran que la proteína *knob* del *fiber* también contribuye a la inmunogenicidad de estos vectores, aunque en menor magnitud (Bradley et al., 2012; Nanda et al., 2005; Sarkioja et al., 2008).

El genoma adenoviral está formado por una doble cadena de DNA y tiene una longitud de aproximadamente 36 kilobases. Flanqueando el genoma, en ambos extremos, se encuentran las denominadas secuencias ITR (*inverted terminal repeat*), que sirven como origen de replicación durante la producción viral dentro de las células huésped (Shinagawa et al., 1987). Además, ha sido identificado un elemento *cis* cerca del final del genoma que serviría para un empaquetamiento eficiente (Hearing et al., 1987). El vector adenoviral de primera generación tiene el gen *early* E1 deletado. El gen E1 es necesario para la expresión del resto de genes *early*: E2, E3 y E4. Los cuatro genes codifican polipéptidos importantes para la regulación de la expresión génica viral y celular durante la infección y para la replicación de los viriones. Así pues, la delección de E1 imposibilita la replicación de estos vectores, condición indispensable para la bioseguridad de los pacientes. Gracias a la línea humana de hepatocitos embrionarios 293, que complementa en *trans* la deficiencia de E1, su producción es posible *in vitro*.

A diferencia de lo sucedido con otros vectores, como los retrovirus (Brown et al., 1989), el ciclo de reproducción del adenovirus no contempla la integración del genoma viral en el genoma de la célula huésped, por lo que éste permanece en el núcleo formando un episoma lineal. Por consiguiente, la expresión de la proteína terapéutica es transitoria, pues la división celular comporta la pérdida del transgen. Sin embargo, la expresión del transgen se da de forma rápida y eficiente tras la infección. Esto hace que los adenovirus sean idóneos para aproximaciones terapéuticas rápidas y puntuales.

3.2.4 Virus quiméricos

Como se ha comentado anteriormente, el Ad5 es uno de los principales vectores utilizados en terapia génica por varios motivos, como su capacidad de infectar gran variedad de tipos celulares y de tejidos, y su eficiente producción. No obstante, existen algunas limitaciones del uso de Ad5 como vector de terapia génica, principalmente debidas a su tropismo.

El tropismo de Ad5 se basa en la presencia del receptor CAR en las células (Bergelson et al., 1997; Henry et al., 1994; Louis et al., 1994; Tomko et al., 1997). Este receptor se encuentra muy repartido por el organismo, otorgando al Ad5 un tropismo extenso.

Para algunas estrategias terapéuticas donde se requiera una expresión sistémica del transgen, ello puede suponer una ventaja. Sin embargo, para aproximaciones terapéuticas más localizadas el amplio tropismo del Ad5 es un problema. Además, una terapia dirigida a células o tejidos que no expresen el receptor CAR será muy ineficiente (Cripe et al., 2001; Hemmi et al., 1998; Kaner et al., 1999).

En consecuencia, se han desarrollado estrategias que permitan modificar el tropismo del Ad5. Una de las principales es la generación de vectores quiméricos por modificación genética la cápside del Ad5, lo cual alteraría su tropismo (Krasnykh et al., 2000). Principalmente, se modifica la proteína *fiber* de la cápside, toda ella, o el dominio *knob*, situado en la parte distal de la fibra. Este proceso llamado *pseudotyping* defiende la posibilidad de aportar un tropismo diferente a los vectores Ad5, manteniendo el resto del genoma del Ad5, y por tanto sus beneficios, como la bioseguridad (Krasnykh et al., 1996; Stevenson et al., 1997; Zabner et al., 1999).

El Adenovirus 40 (Ad40) es un adenovirus entérico del subgrupo F, muy presente en la gastroenteritis infantil (Cunliffe et al., 2010; Uhnoo et al., 1984; Wilhelmi et al., 2003). Gracias a su tropismo intestinal es una herramienta prometedora para la terapia génica de enfermedades intestinales. Sin embargo, la producción de Ad40 *in vitro* es extremadamente ineficiente (Sherwood et al., 2007; Tiemessen and Kidd, 1994). Además, este serotipo no está completamente caracterizado para su empleo como vector de terapia génica, por lo que podría acarrear problemas de bioseguridad. Así pues, el uso de un vector quimera que combine el genoma del adenovirus 5 y el *fiber* perteneciente al serotipo 40, sería idóneo para una aproximación terapéutica intestinal.

El artículo publicado por nuestro grupo sobre el adenovirus quimera Ad5/40S (Rodríguez et al., 2013), establece que éste conserva el tropismo intestinal del Ad40. Además, no sólo presenta resistencia al medio ácido y las proteasas existentes en el tracto digestivo, sino que incluso los vectores quimeras Ad5/40S se activan tras la exposición a un pH ácido.



II. Objetivos

1. Producción de vectores virales portadores del gen IL23Rs o IL23R:
 - Diseño y generación del gen.
 - Clonación del gen en vectores adenovirales y adenoasociados.
 - Producción y purificación de los diferentes vectores virales.
 - Optimización de la producción del vector quimera Ad5/40S *in vitro*.

2. Caracterización del tropismo de Ad5, Ad5/40S y diferentes pseudotipos de vectores AAV:
 - *In vitro* para células T CD4+ murinas.
 - *In vivo* para *stem cells* de intestino en ratón.

3. Caracterizar la expresión y actividad de IL23Rs:
 - Comprobar la secreción de IL23Rs al medio extracelular.
 - Estudiar la distribución celular de IL23R e IL23Rs.
 - Analizar la interacción *in vitro* entre IL23 e IL23Rs.

4. Estudiar el potencial terapéutico de IL23Rs en ratones EAE como modelo murino de Esclerosis Múltiple:
 - Determinar si el tratamiento con IL23Rs modifica significativamente el curso clínico de la enfermedad.
 - Realizar el análisis histopatológico de los ratones con EAE.
 - Estudiar el perfil inmunológico de estos ratones.

