



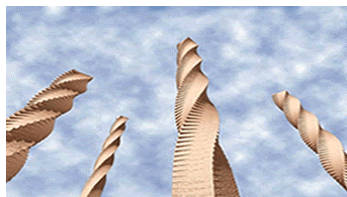
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR, DE FISIOLOGIA I D'IMMUNOLOGIA

Tesi Doctoral

**Influència de la irradiació, la dosi cel·lular i la manipulació *ex vivo*  
en l'empelt de cèl·lules hemopoètiques murines transduïdes**

Teresa Puig i Miquel

Barcelona 2001



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia  
Unitat de Biologia Cel·lular

**Influència de la irradiació, la dosi cel·lular i la manipulació *ex vivo*  
en l'empelt de cèl·lules hemopoètiques murines transduïdes**

Memòria presentada per adquirir el grau de Doctor  
per la Universitat Autònoma de Barcelona, per  
**Teresa Puig i Miquel**

Vist-i-plau  
El Director de la Tesi

Vist-i-plau  
La Tutora de la Tesi

**Dr. Jordi Barquinero i Máñez**  
Investigador del Centre de Transfusió i Banc  
de Teixits de l'Hospital Vall d'Hebrón

**Dra. M<sup>a</sup> Dolors Coll i Sandiumenge**  
Professora Titular de Biologia  
Cel·lular

Barcelona, abril de 2001

Cap raonament, per sensat que sigui, ens permetrà, contemplant una llavor de poma, preveure la forma de l'arbre que en sorgirà, ni el gust de la fruita que produirà l'arbre. L'observador escolta la natura, l'experimentador l'interroga i la força a descobrir els seus secrets.

A. MARUROIS

L'home, amb totes les seves nobles qualitats, encara porta en la seva estructura corporal el rastre indeleble del seu origen humil.

CHARLES DARWIN

*A en Salva*

## **AGRAÏMENTS**

Especialment a Jordi Barquiner, per oferir-me l'oportunitat de conèixer el món de la recerca. Agrair-li la confiança que ha dipositat en mi i en el projecte. Per la revisió, sempre crítica i exhaustiva, del treball de recerca i pels bons consells informàtics.

A l'Anna Limón li voldria agrair l'ajuda i l'afecte que sempre he rebut d'ella. Per totes les estones bones (i no tan bones) que hem passat conjuntament amb els antics i els nous companys de "virus", sempre lluitant junts i mirant endavant. Gràcies per les ganes de lluitar que m'has transmès.

A l'Elisabeth Kádár qui, tot i incorporar-se al grup més endavant, ha estat una persona molt important en la realització de la part *in vivo* d'aquest treball. M'ha ajudat sempre que li he demanat. Amb ella he compartit els millors i els pitjors camins que travessen el complex món de la recerca. Per una amistat que va començar a l'estabulari i es manté ferma en la geografia.

A la Susana Arias, amb qui vaig compartir un període de treball dur i molt intens. Tot i que no era la seva responsabilitat, sempre va estar disposada a donar un cop de mà. També una bona amiga que sempre tenia paraules d'ànim en els moments difícils.

A la resta de companys del departament que, d'una manera o altra, han contribuït en la realització d'aquest treball. Especialment a José Antonio Cancelas li voldria agrair la seva total disposició sempre que l'he necessitat.

M'agradaria recordar també a la gent amb la que en un moment o altre he coincidit al laboratori: la Glòria Julià, en Joan Bertran i la Mercè Serravinyals.

Als responsables de l'estabulari de l'IRO. Especialment a la Blanca, una gran apassionada de la seva feina que sempre està disposada a donar un cop de mà.

Al Servei de Radioteràpia de l'ICO per la seva bona disposició i assistència. Per fer cabuda, amb bon humor, a les múltiples "caixes de ratolins" que rebien contínuament.

Als nous companys de la Universitat de Girona, els voldria agrair la paciència i bones paraules dedicades a suavitzar els inescapables últims moments.

Agrair a l'IRO el suport rebut i fer constar que aquest treball s'ha realitzat gràcies a la beca pre-doctoral per la Formació de Personal Investigador concedida per la CIRIT.

Finalment, l'agraïment que ve del fons del cor per tota la meva família, sobretot la meva mare, la Maria. És la persona que m'ha encoratjat més en tot moment i sense la qual no hagués tirat endavant en l'aventura de la recerca i en moltes altres. Només en Salva ha estat tant comprensiu com la Maria. Sens dubte, aquesta tesi és també en part obra seva.

*GRÀCIES A TOTS*

## **ÍNDEX**

<b>Índex</b>	I-IV
<b>Abreviatures</b>	V
<b>Resum</b>	VI
<b>Introducció</b>	1
<b>I. <u>El sistema hemopoètic</u></b>	
1. El sistema hemopoètic	2
1.1. Desenvolupament del sistema hemopoètic del ratolí	3
1.2. Estructura	4
1.2.1. Les cèl·lules hemopoètiques	7
1.2.2. L'estroma hemopoètic	9
1.2.3. La matriu extracel·lular	10
2. Factors de creixement hemopoètics	12
2.1. El factor estimulador de cèl·lules mare (SCF)	13
2.2. L'IL-3	14
3. La nidificació de les CMH al MO	15
4. Estudi de les CMH murines	16
4.1. Caracterització fenotípica de les CMH murines	17
4.1.1. Marcadors de membrana presents a les cèl·lules hemopoètiques murines	18
4.2. Assaigs funcionals per cèl·lules hemopoètiques primitives	18
4.2.1. Caracterització mitjançant cultius <i>in vitro</i> dels progenitors hemopoètics	19
4.2.2. Determinació de les cèl·lules amb capacitat de repoblació a curt (STRA) i a llarg termini (LTRA): assaig de reconstitució a curt i llarg termini i assaig de repoblació competitiva	21
<b>II. <u>Biologia del TMO</u></b>	
5. Trasplantament del moll de l'os. Del passat al present	23
5.1. Tipus de TCH	24
5.2. Models experimentals per l'estudi del quimerisme hematològic	26
6. Dany hemopoètic induït per les radiacions ionitzants	27
6.1. Efectes de les radiacions a nivell de l'organisme	
Síndromes de la irradiació	28
7. Necessitat de condicionament per l'empelt de les cèl·lules trasplantades	33
7.1. "Minitrasplantament"	34

III. Transferència gènica a cèl·lules hemopoètiques

8. Teràpia gènica	35
8.1. Mecanismes de transferència gènica	36
8.2. Els vectors basats en virus	37
8.3. Els retrovirus	39
8.3.1. Vectors retrovírics recombinants	41
8.3.2. El receptor ecotròpic del VLMoMu	42
8.3.3. El pseudotipatge. Noves solucions en l'enginyeria de vectors	44
8.3.4. El silenciament de l'expressió gènica	45
9. Marcatge gènic. Eina d'estudi de la biologia de la CMH	47
9.1. Gens marcadors	48
9.1.1. (E)GFP	49
10. Transferència gènica a CMH	50
10.1. Transferència gènica a CMH no humanes	52
10.2. Transferència gènica a CMH humanes	54
10. Protocols clínics de teràpia gènica amb CMH	57
<b>Objectius</b>	61
<b>Material i Mètodes</b>	65
1. Animals	65
2. Irradiació	65
3. Obtenció de cèl·lules del MO	66
4. Extracció de cèl·lules de SP	66
5. Obtenció de cèl·lules de la melsa	67
6. Obtenció dels medis condicionats	67
6.1. Obtenció del MC WEHI	68
6.2. Obtenció del MC BHK	68
7. Cultius cel·lulars	69
7.1. Congelació i descongelació de les línies cel·lulars	69
7.2. Descontaminació de la línia de micoplasmes	70
8. Obtenció de la línia cel·lular productora de retrovirus NX-E/EGFP	71
8.1. Titulació de la línia NX-E/EGFP	71
8.2. Test de rescat del marcador de la línia productora NX-E/EGFP	72
8.3. Anàlisi de l'ADN de la línia productora NX-E/EGFP per <i>Southern blot</i>	72
9. Cultius clonogènics de progenitors hemopoètics en metilcel·lulosa	74

10. Anàlisi per citometria de flux	74
10.1. Immunofluorescència de les cèl·lules en suspensió. Tinció directa i indirecta	76
10.2. Anàlisi de les mostres per citometria de flux	76
10.3. Valoració de les dades citomètriques	78
11. Estudi de l'empelt hemopoètic	81
12. Anàlisi estadística	82
<b>Resultats</b>	<b>85</b>
<u>I. Desenvolupament d'un protocol de transducció amb retrovirus <i>in vitro</i> de progenitors hemopoètics murins amb capacitat de repoblació a llarg termini</u>	
1. Obtenició i caracterització d'una línia cel·lular productora de retrovirus ecotròpics (NX-E/EGFP)	85
1.1. Generació de la línia productora NX-E/EGFP	86
1.2. Caracterització de la línia productora NX-E/EGFP	87
1.2.1 Estudi de l'efecte de diferents variables (sulfat de protamina, centrifugació de les plaques de cultiu, incorporació del fragment CH-296 de la fibronectina humana recombinant) en l'eficiència de transducció de cèl·lules NIH/3T3 per les línies productores de retrovirus: NX-E/EGFP i PA317/EGFP	89
1.2.2 Determinació del títol víric de la línia NX-E/EGFP	91
1.3. Estudi de la integració del vector SF-EGFP a la línia cel·lular productora. Determinació del número de còpies del provirus presents al genoma de la línia NX-E/EGFP	93
2. Optimització d'un protocol de transducció de cèl·lules de MO murines	94
2.1. Estudi de la influència del sulfat de protamina, la centrifugació de les plaques de cultiu i el fragment CH-296, en l'eficiència de transducció de les cèl·lules hemopoètiques murines	96
2.2. Efecte del període de pre-incubació de les cèl·lules de MO amb citocines, en l'eficiència de transducció	99
2.3. Protocol definitiu de transducció de cèl·lules de MO murines	101
<u>II. Estudi de l'empelt de les cèl·lules hemopoètiques transduïdes</u>	
3. Establiment de la corba de supervivència dels ratolins C57BL/6J post-ICT	103
4. Evolució de l'expressió d'EGFP <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>	104
4.1. Expressió d'EGFP a MO abans del trasplantament ( <i>in vitro</i> )	105



4.2. Expressió d'EGFP a SP, melsa i MO dels ratolins trasplantats ( <i>in vivo</i> )	112
5. Estudi de la influència de la manipulació <i>ex vivo</i> , la dosi cel·lular i la irradiació, en l'empelt de cèl·lules hemopoètiques murines transduïdes amb retrovirus	113
5.1. Efectes de la transducció retrovívica en la repoblació de ratolins, no irradiats i irradiats amb diferents dosis d'ICT, trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules de MO	118
5.1.1. Efectes de la transducció retrovívica en la repoblació hemopoètica de ratolins condicionats amb una dosi de 4 Gy	121
5.2. Efectes de la dosi de cèl·lules trasplantades en la repoblació hemopoètica de ratolins irradiats amb dosis subletals d'ICT	126
5.3. Relació entre la dosi d'ICT (Gy) administrada i l'empelt aconseguit en ratolins trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ o $5 \times 10^6$ cèl·lules transduïdes o $0,5 \times 10^6$ cèl·lules no transduïdes	130
<b>Discussió</b>	148
<b>Conclusions</b>	152
<b>Bibliografia</b>	174

## **ABREVIATURES**

## Abreviatures

7-AAD	7-aminoactinomicina D	MESV	<i>murine embryonic stem cell virus</i>
ADA	adenosina desaminasa	MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
ADN	àcid desoxiribonucleic	MO	moll de l'os
APC	alofococianina	NOD	<i>non obese diabetic</i>
ARN	àcid ribonucleic	NK	cèl·lula <i>natural killer</i>
ARNm	àcid ribonucleic missatger	PE	ficoeritrina
CD	<i>cluster denomination</i>	PCR	<i>polimerase chain reaction</i>
CFC	cèl·lula formadora de colònia	RCR	<i>replicative competent retrovirus</i>
CFU	unitat formadora de colònia	Sca-1	<i>stem cell antigen-1</i>
CFU-E	cèl·lula formadora de colònies eritroides	SCU	sang de cordó umbilical
CFU-GM	cèl·lula formadora de colònies granulo- macrofàgiques	SCF	<i>stem cell factor</i>
CS-1	<i>central site-1</i>	SP	sang perifèrica
CSF	factor estimulator de colònies	STR/A	<i>short term repopulation / ability</i>
CMH	cèl·lula mare hemopoètica	SS	<i>side scatter</i>
CMN	cèl·lula mononucleada	SRC	<i>SCID repopulation cells</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>	TCH	trasplantament de cèl·lules hemopoètiques
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>	TMO	trasplantament del moll de l'os
FCS	<i>fetal calf serum</i>	TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
FITC	isotiocianat de fluoresceïna	TPO	trombopoietina
Flt3-L	l·ligand del receptor Flt3	VIH-1	virus de l'immunodeficiència humana adquirida tipus 1
FN	fibronectina	VLMoMu	virus de la leucèmia de Moloney murina
FS	<i>forward side</i>	VSV-G	<i>vesicular stomatitis virus-G protein</i>
5-FU	5-fluorouracil	WGA	<i>wheat germ agglutinin</i>
GALV	<i>Gibbon ape leukemia virus</i>		
G-CSF	factor estimulator de colònies granulocítiques		
GM-CSF	factor estimulator de colònies granulo- macrofàgiques		
GFP	<i>green fluorescent protein</i>		
GVHD	<i>graft versus host disease</i>		
ICT	irradiació corporal total		
IL	interleucina		
IF	interferó		
i.p.	intraperitoneal		
i.v.	intravenós		
KL	<i>kit ligand</i>		
Hb	hemoglobina		
Lin <sup>-/low</sup>	cèl·lula sense o amb expressió reduïda d'antígens llinatge-específics		
LTR/A	<i>long term repopulation / ability</i>		
LTR	<i>long terminal repeat</i>		
MC BHK	medi condicionat de la línia <i>baby hamster kidney</i>		
MC Wehi	medi condicionat de la línia WEHI BD <sup>+</sup>		
M-CSF	factor estimulator de colònies macrofàgiques (també anomenat CSF-1)		
MDR-1	<i>multidrug resistance gene-1</i>		
ME	matriu extracel·lular		

## Resum

Per estudiar la influència de la dosi d'irradiació, la dosi cel·lular trasplantada i la manipulació *ex vivo* en l'empelt de cèl·lules hemopoètiques murines transduïdes amb retrovirus, grups de ratolins receptors C57BL/6J (CD45.2) varen ser irradiats (rang de dosis: 1-9 Gy d'ICT-irradiació corporal total-) i es varen trasplantar amb  $0,5 \times 10^6$  i  $5 \times 10^6$  cèl·lules del moll de l'os (MO) murines transduïdes amb vectors retrovírics que contenen el gen marcador EGFP o amb  $0,5 \times 10^6$  cèl·lules del MO no manipulades. En cada cas també es trasplantaren ratolins no irradiats. Les cèl·lules procedien de ratolins donants B6/SJL (CD45.1) tractats amb 5-FU. Es va analitzar l'empelt a curt (40 dies) i a llarg termini (22 setmanes) i l'expressió del transgen als teixits hemopoètics dels ratolins receptors. No es varen detectar cèl·lules del donant, ni a curt ni a llarg termini en els grups de ratolins no irradiats. No obstant, es va relacionar d'una manera lineal i dosi-depenent la irradiació amb l'empelt hemopoètic, tant a curt com a llarg termini. Independentment de la dosi d'irradiació rebuda i el nivell d'empelt aconseguit, es varen obtenir percentatges similars d'expressió del transgen en tots els grups d'animals trasplantats, suggerint que en aquests animals les respostes immunitàries contra les cèl·lules que expressaven EGFP eren absents o bé suficientment lleus com per no afectar la supervivència de les cèl·lules transduïdes en els receptors. A més, el fet que es mantingués l'elevat percentatge de cèl·lules transduïdes *in vivo* als 40 dies i a les 22 setmanes després del trasplantament ( $60,5 \pm 15,7$  %), indicava que probablement s'havien transduït cèl·lules mare (CMH) amb la mateixa capacitat repobladora que les CMH no transduïdes. El trasplantament de 10 vegades més cèl·lules transduïdes ( $5 \times 10^6$  cèl·lules) o  $0,5 \times 10^6$  cèl·lules no transduïdes, resultà en uns nivells d'empelt significativament més elevats que quan es trasplantaren  $0,5 \times 10^6$  cèl·lules transduïdes, a totes les dosis d'ICT analitzades. Aquests resultats indiquen que l'ICT facilita l'empelt de cèl·lules transduïdes o no, de manera dosi depenent; que els ratolins empeltats amb cèl·lules EGFP<sup>+</sup> probablement desenvolupen tolerància immunològica a les cèl·lules que expressen el transgen i que, augmentant el número de cèl·lules trasplantades i reduint la manipulació *ex vivo* necessària per la transducció de les CMH, es facilita l'empelt hemopoètic, un dels principals obstacles que limiten l'ús de teràpies gèniques amb CMH.

## **INTRODUCCIÓ**

## ***I. El Sistema Hemopoètic***

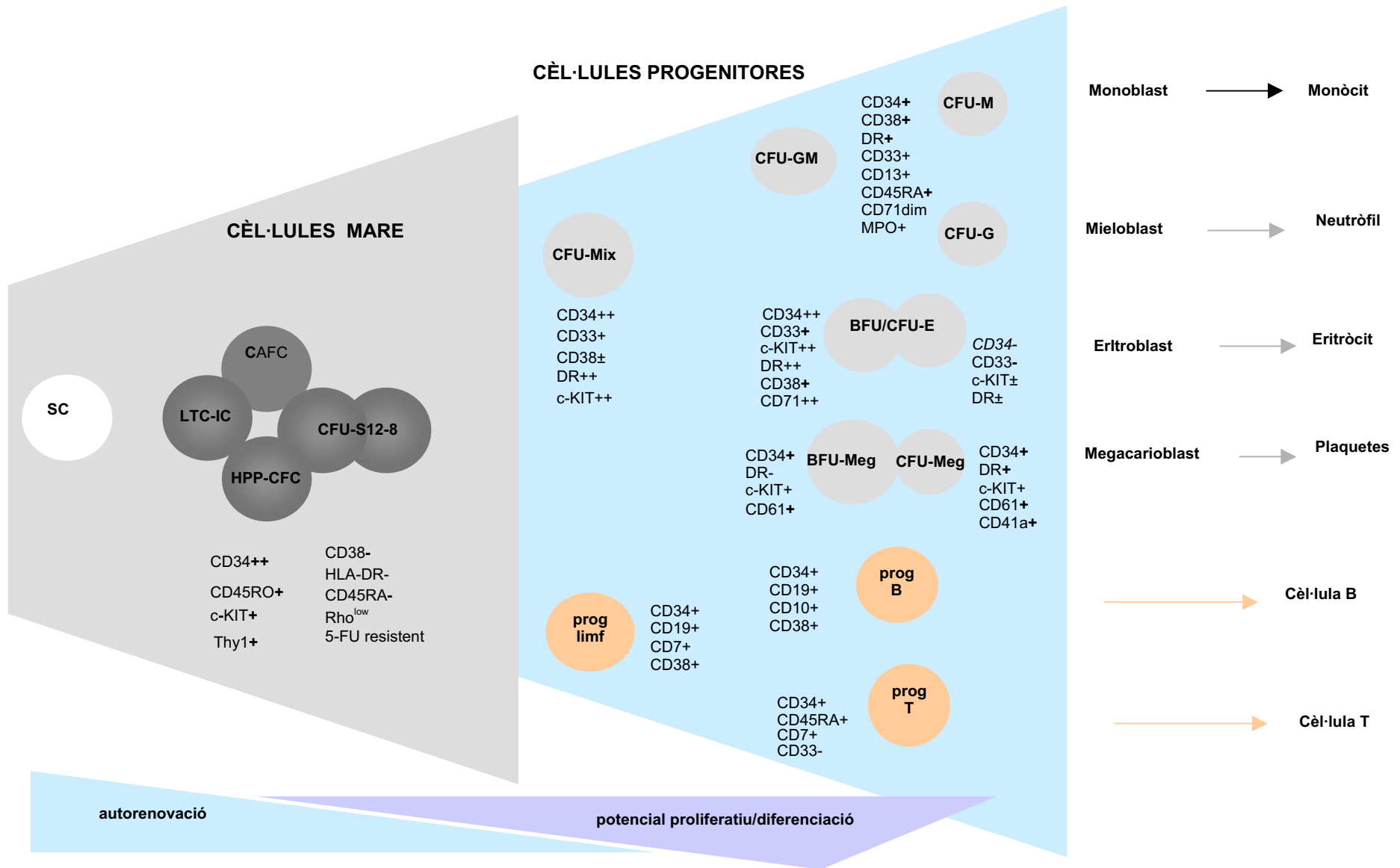
### **1. El sistema hemopoètic**

La formació i desenvolupament de les cèl·lules sanguínies, o hemopoesi, normalment té lloc al MO, principal òrgan hemopoètic de l'individu adult. Degut que les cèl·lules de la sang madures (eritròcits, granulòcits, limfòcits, monòcits i plaquetes) tenen un temps de vida mitja relativament curt i que el nombre d'aquestes cèl·lules es manté constant al llarg de tota la vida de l'animal, l'hemopoesi es desenvolupa com un procés de contínua renovació cel·lular. Una petita població de cèl·lules del MO, les CMH, són les responsables de la formació de les cèl·lules sanguínies (1). Aquestes cèl·lules es caracteritzen per la seva capacitat d'autorenovació, totipotencialitat (diferenciació cap a tots els llinatges hemopoètics) i reconstitució a llarg termini de l'hemopoesi en receptors irradiats letalment. La freqüència de CMH al MO del ratolí adult és molt baixa, s'ha estimat en 1-2 cada  $10^5$  cèl·lules mononuclears (CMN) del MO, la mateixa proporció que s'observa al MO de l'humà adult (2). El microambient medular té un paper fonamental en la regulació de la proliferació i/o diferenciació d'aquestes cèl·lules; tant a través de la síntesi de factors solubles estimuladors i inhibidors com a través de les interaccions entre les cèl·lules hemopoètiques i els elements cel·lulars i extracel·lulars que el constitueixen. Igualment es regula també l'amplificació dels progenitors hemopoètics generats a partir de les cèl·lules mare així com la seva posterior diferenciació a cèl·lules madures funcionals. Finalment, quan les cèl·lules hemopoètiques han completat el seu procés maduratiu són lliurades a la circulació sistèmica on desenvoluparan les funcions corresponents.

En general, s'accepta que en condicions basals la majoria de CMH es troben quiescents (en fase  $G_0$  del cicle cel·lular) i que només un petit percentatge d'aquestes cèl·lules estan en proliferació per poder cobrir la constant demanda de cèl·lules madures. Igualment, les CMH són, en última instància, les responsables de regenerar l'hemopoesi en condicions d'estrès com les que resulten després d'un trasplantament de MO o després d'un dany greu produït per irradiació o agents citotòxics.

Les cèl·lules sanguínies s'han classificat en dos llinatges de diferenciació (Fig.1):

- i) El llinatge mieloide que inclou: cèl·lules eritroides, monòcits, granulòcits i megacariòcits i els macròfags tissulars: cèl·lules de Kupffer del fetge, els macròfags alveolars en els pulmons, els osteoclasts, les cèl·lules de Langerhans a la pell, la micròglia en el sistema nerviós central i les cèl·lules dendrítiques del teixit limfoide.
- ii) El llinatge limfoide que comprèn les cèl·lules T, les cèl·lules B i les cèl·lules NK.



**Fig.1.** Esquema del procés de diferenciació de les cèl·lules mare hemopoètiques. (sc, *stem cell*; LTC-IC, cèl·lules iniciadores de cultiu a llarg termini; CAFC, cèl·lules formadores d'àrees empedrades; CFU-S; cèl·lula formadora de colònies a la melsa; BFU-E/Meg; unitat formadora de colònies eritroides/megacariocítiques en *burst*, CFU-mix; unitat formadora de colònies mixtes, CFU-GM; CFU-granulo-macrofàgiques, CFU-Meg/E; CFU-megacariocítiques/eritroides; prog limf; progenitor limfoide).

### 1.1. Desenvolupament del sistema hemopoètic del ratolí

Durant l'embriogènesi dels vertebrats, diferents regions anatòmiques de l'embrió en desenvolupament mostren activitat hemopoètica. En els mamífers, l'hemopoesi s'inicia en les regions extraembrionàries del mesoderma (al sac vitel·lí), posteriorment s'esdevé en el fetge embrionari i, finalment, a la melsa i al MO. En el moment del naixement, el MO és pràcticament l'únic lloc d'hemopoesi activa (2).

En el ratolí, la capa germinal mesodèrmica es forma 6,5 dies postcoitium (dpc). Són dos els llocs embrionaris on es desenvolupa una activitat hemopoètica abans que el rudiment del fetge fetal comenci a formar-se 9 dpc: les regions internes dels illots sanguinis del sac vitel·lí, on s'observa creixement de progenitors que donen lloc a macròfags, granulòcits i limfòcits T i B madurs; i les cèl·lules derivades de l'àrea AGM (que comprèn les regions aorta, canal genital i mesonefres de l'embrió) que són capaces de generar limfòcits B i T i cèl·lules mieloides (3). A partir del dia 10 dpc comencen a aparèixer seqüencialment al fetge les primeres cèl·lules no nucleades productores de globina adulta, cèl·lules progenitores mieloides tipus CFC, macròfags i cèl·lules B i cap al dia 11 dpc progenitors més immadurs tipus LTR (apartat 4.2.2. Introducció). És curiós el fet que l'ordre temporal d'aparició de les primeres cèl·lules hemopoètiques a l'embrió no reflecteixi la jerarquia d'aquestes cèl·lules a l'adult. Per aquesta raó, es diferencien les cèl·lules mare neonatals (en la fase prefetal) i les cèl·lules mare definitives (presentes en el fetge fetal i equivalents a les cèl·lules mare de l'adult) atenent a les seves característiques funcionals, especialment quant al temps requerit per a la seva diferenciació i al seu potencial proliferatiu.

Actualment s'accepta que les cèl·lules progenitores hemopoètiques no es generen de *novo* al fetge sinó que hi arriben (del sac vitel·lí o la regió AGM) i colonitzen el teixit. Una vegada colonitzat, el fetge fetal es converteix en la principal font d'hemopoesi fetal fins poc abans del naixement, quan el MO s'estableix com a teixit hemopoètic definitiu.

En el ratolí adult, a diferència dels humans, la melsa continua disposant d'un microambient adequat per a l'hemopoesi essent una font important d'eritropoesi a més de contenir un nombre important de CMH.



## 1.2 Estructura

El teixit hemopoètic està format per tres elements essencials: les cèl·lules hemopoètiques, les cèl·lules de l'estroma i els components de la matriu extracel·lular (ME).

En la cavitat medul·lar de l'os, les cèl·lules hemopoètiques se situen al voltant d'una trama de cèl·lules fibroblàstiques, reticulars i adiposes que formen l'estroma hemopoètic. Aquesta trama és travessada pels capil·lars sanguinis que formen els sinusoides medul·lars. L'hemopoesi té lloc en l'espai extravascular medul·lar entre els sinusoides, on s'estructuren els diferents progenitors hemopoètics. Sembla ser que l'estructuració i distribució dels progenitors hemopoètics té a veure amb l'existència de llocs o nínxols específics per al manteniment de la quiescència i proliferació de les CMH i nínxols de diferenciació als quals migren els progenitors hemopoètics més madurs (4).

Durant l'hemopoesi les CMH proliferen i es diferencien en progenitors hemopoètics compromesos cap a un o diversos llinatges cel·lulars. Aquests progenitors pateixen unes quantes divisions cel·lulars abans de diferenciar-se i finalment donen lloc a les cèl·lules hemopoètiques madures. Una vegada les cèl·lules hemopoètiques han completat el seu procés de maduració, són lliurades a la llum dels sinusoides a través de les fenestracions (zones d'interrupció de la membrana citoplasmàtica) presents a les cèl·lules endotelials i són lliurades a la circulació sistèmica.

### 1.2.1 Les cèl·lules hemopoètiques

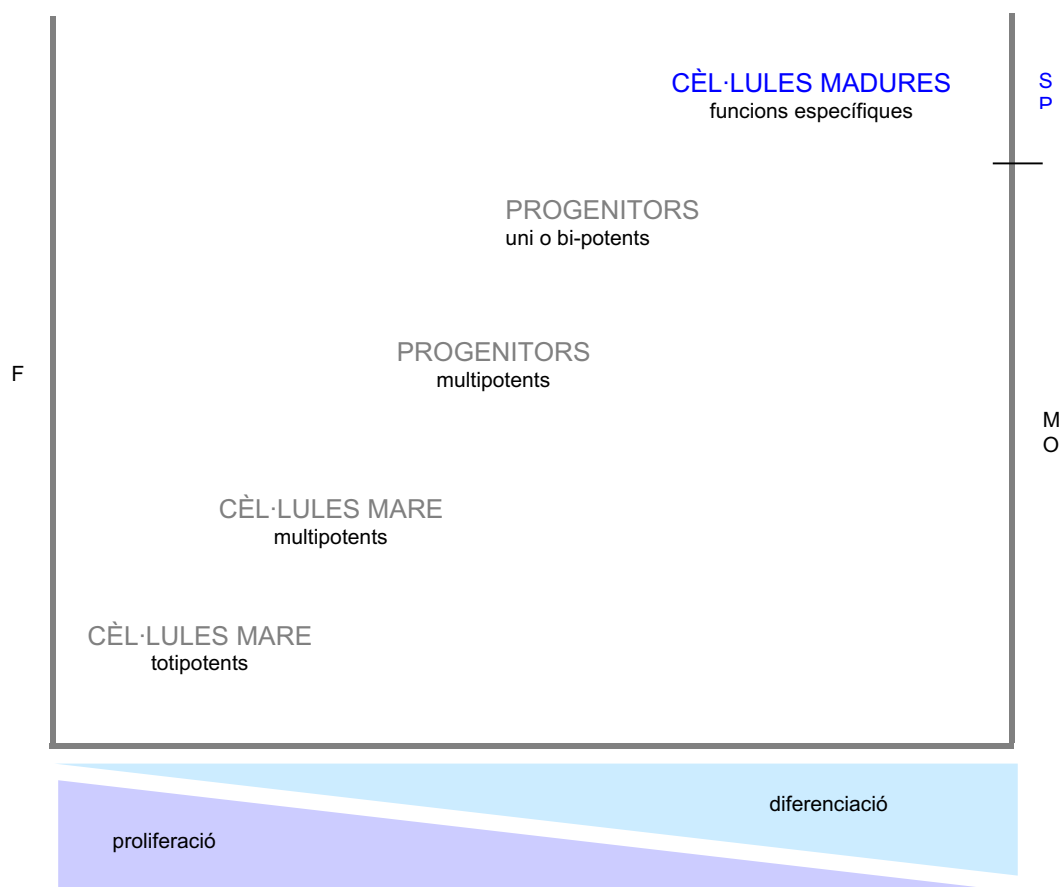
Tradicionalment, les poblacions cel·lulars hemopoètiques han estat classificades en tres compartiments o subclasses (Fig.2):

i) **Cèl·lules mare hemopoètiques.** Es defineixen per presentar dues propietats: la totipotencialitat i la capacitat contínua d'autorenovació, és a dir, de mantenir el seu número durant tota la vida de l'individu, que rau entre 1-2 cada  $10^5$  CMN del MO. Com a totipotencialitat s'entén que les cèl·lules mare posseeixen la capacitat de generar cèl·lules de tots els llinatges limfohemopoètics. El manteniment de l'estat estacionari de l'hemopoesi requereix que es mantingui l'equilibri entre aquestes dues propietats. No obstant, el sistema és extraordinàriament flexible i permet l'expansió ràpida del compartiment després d'una situació de dany o estrès, com ara el tractament amb agents citotòxics (quimioteràpia o radioteràpia) o amb factors de creixement endògens i/o el trasplantament de MO. Una tercera característica de les CMH, que va lligada a les altres dues propietats, és la capacitat de reconstitució a llarg termini de l'hemopoesi en receptors irradiats letalment.

i) Característiques de l'autorenovació:

Referent a la cinètica de proliferació de les cèl·lules mare s'han proposat dos models teòrics: el de la successió clonal i el del cicle permanent alentit. El primer considera que, en condicions basals la majoria de CMH del MO són quiescents (en fase  $G_0$  del cicle cel·lular) i que només un petit percentatge es troba en fase activa del cicle cel·lular per suplementar, si és necessari, totes les cèl·lules hemopoètiques. Segons aquest model, la producció sanguínia diària és mantinguda per l'activitat seqüencial de pocs clons de CMH. Varis estudis emparen aquesta teoria (5-7). Igualment, diferents estudis de marcatge retrovíric en el model murí i caní, on es mesura la contribució relativa a l'hemopoesi dels diferents clons de CMH marcades en el temps, proporcionen una evidència experimental del model de successió clonal (8-10). Un estudi realitzat pel nostre grup (11) i el treball de Guenechea i col, indiquen que probablement amb cèl·lules humanes passa el mateix (12). Contràriament, Harrison i col defensen el model que molts clons de cèl·lules mare proliferen i contribueixen simultàniament a la producció de les cèl·lules sanguínies durant tota la vida de l'organisme (13). Per tant, tot i que les cèl·lules mare es podrien considerar quiescents en relació amb les poblacions progenitores a les quals donen lloc, en el seu estat basal es trobarien contínuament en divisió, però molt lentament.

En tot cas, el compartiment de cèl·lules mare sembla molt heterogeni, és a dir, inclou diferents tipus de cèl·lules mare primitives ordenables sobre la base de la seva quiescència. La diferenciació d'aquestes cèl·lules implicaria una disminució en la seva capacitat d'autorenovació, pluripotencialitat i potencial proliferatiu així com un increment en la seva velocitat de recanvi (7). De totes, les cèl·lules mare més primitives serien aquelles amb una velocitat de recanvi molt lenta però amb una capacitat elevada d'autorenovació i de diferenciació en tots els llinatges hemopoètics. Sota condicions d'estrès, com les que resulten després de la depleció cel·lular produïda per irradiació o agents citotòxics (14), la seva cinètica es modificaria i serien induïdes a proliferar ràpidament. Igualment, els factors de creixement tenen un paper fonamental en l'entrada en cicle dels progenitors hemopoètics quiescents més immadurs (15-19).



**Fig.2.** Compartimentació de les cèl·lules hemopoètiques en base a criteris de diferenciació i proliferació (F; freqüència, SP; sang perifèrica, MO; moll de l'os).

ii) Característiques de la totipotencialitat i diferenciació de les CMH:

Quant a la diferenciació de les CMH, s'han proposat també dos models teòrics oposats: el model estocàstic i el model determinista (20). En el model estocàstic, es considera que la diferenciació de les cèl·lules mare és un procés aleatori de manera que la generació dels diferents progenitors no té un ordre o patró predeterminat. En canvi, el model determinista considera que el procés diferenciatiu segueix sempre la mateixa seqüència o jerarquia. Dins aquest últim s'inclouen el model del microambient hemopoètic inductor (HIM) que assumeix l'existència de llocs o nínxols anatòmics específics de llinatge que dirigirien la diferenciació dels progenitors no compromesos, el model de competició que estableix la regulació de la diferenciació de les CMH mitjançant la competició pels diferents factors de creixement humorals i el model de pèrdua progressiva del potencial diferenciatiu.

A favor del primer model hi ha els treballs del grup d'Ogawa (6, 21) que demostren la formació de colònies multilinatge formades per combinacions variables de cèl·lules de diferents llinatges (segons el model determinista les colònies multilinatge haurien de mostrar combinacions sempre fixes) o els treballs en animals transgènics expressant receptors per un factor de creixement determinat, els quals no mostren cap alteració en el procés diferenciatu (22).

Recentment, varis treballs proposen que les cèl·lules mare provinents de teixits adults (múscul, fetge, cervell) poden retenir cert grau de plasticitat en el seu compromís hemopoètic i la seva diferenciació pot ésser influenciada més per l'ambient que pel llinatge (23-26). Per exemple, Jackson i col, aïllaren cèl·lules de múscul esquelètic murí i demostraren que tenien capacitat de regenerar tots els llinatges hemopoètics de ratolins irradiats letalment (23). Suggestiren que podria ser degut que les CMH fossin idèntiques a les cèl·lules musculars satèl·lits, algunes de les quals les hi mancarien els senyals de regulació de la miogènesi i podrien respondre a senyals hemopoètiques. En el treball del grup de Lagasse, han provat la capacitat de les cèl·lules mare purificades i la seva progènie en la regeneració hepàtica en un model murí de tirosinèmia tipus I. Aquest treball aporta dues reflexions importants: la plasticitat de les CMH i la de la seva progènie i el potencial terapèutic d'aquestes cèl·lules com a reparadores tissulars.

ii) **Cèl·lules progenitores.** Les cèl·lules progenitores o progenitors hemopoètics compromesos han estat caracteritzats com a cèl·lules amb una elevada capacitat proliferativa però limitada capacitat d'autorenovació i "compromeses" a diferenciar-se cap un (unipotents), dos (bipotents) o diversos (multipotents) tipus cel·lulars concrets. Dins d'aquest grup s'inclouen les cèl·lules hemopoètiques amb capacitat clonogènica, és a dir, amb capacitat per generar colònies en medis semisòlids (pàgina 19).

iii) **Cèl·lules madures.** Es consideren cèl·lules madures aquelles que mostren unes característiques morfològiques i funcionals específiques. En la línia mieloide, inclosa la sèrie eritroide, granulocítica i megacariocítica, la pèrdua de capacitat proliferativa es troba acoblada al desenvolupament progressiu de les característiques bioquímiques, fenotípiques i morfològiques de cada sèrie de cèl·lules madures. En canvi, certes cèl·lules madures, entre les quals s'inclouen els limfòcits T, B i alguns macròfags tissulars, mantenen la capacitat de proliferació quan són estimulades apropiadament.

### 1.2.2 L'estroma hemopoètic

L'estroma hemopoètic i els components de la ME, aporten el microambient hemopoètic funcional indispensable per a una hemopoesi activa. A més de ser el suport físic on s'imbriquen els progenitors hemopoètics, les cèl·lules de l'estroma participen activament en la regulació del procés mitjançant la producció de factors de creixement que promouen la supervivència i proliferació de les CMH. Per a la regulació de l'hemopoesi també són fonamentals les interaccions entre les cèl·lules hemopoètiques i les de l'estroma. La població de cèl·lules que formen l'estroma hemopoètic és molt heterogènia:

i) Les cèl·lules endotelials formen la paret interna dels sinusoides medul·lars. Tenen activitat endocítica i constitueixen la principal barrera i sistema de control per a l'entrada i sortida d'agents químics i cèl·lules a l'espai hemopoètic.

ii) Les cèl·lules reticulars són el component majoritari de l'estroma. N'hi ha de dos tipus: les cèl·lules reticulars adventícies i les fibroblàstiques. Les cèl·lules adventícies formen la paret luminal dels sinusoides i la seva funció principal és regular la migració de les cèl·lules cap al torrent circulatori. Els fibroblastes, mitjançant un procés d'allargament citoplasmàtic, s'encarreguen de sintetitzar les fibres reticulars que proporcionen el coixí físic on resten les cèl·lules hemopoètiques. Es localitzen en les zones d'hemopoesi activa.

iii) Els adipòcits es desenvolupen, igual que les cèl·lules reticulars adventícies, a partir de cèl·lules de tipus fibroblast que adquireixen capacitat lipogènica. Es troben íntimament associats a les parets dels sinusoides i a les àrees d'hemopoesi activa.

iv) Els macròfags, tot i que no tenen el seu origen en cèl·lules de l'estroma, es consideren una part funcional d'aquest ja que tenen un paper important en la producció de citocines.

v) Les cèl·lules "en llençol" (o *blanket cells*) segreguen components (fibronectina i laminina) implicats en la migració de macròfags i granulòcits, formant les àrees de granulopoesi activa.

Les cèl·lules de l'estroma produeixen una gran varietat de citocines (SCF, IL-6, CSF, GM-CSF, G-CSF), d'aquí prové el seu paper regulador de l'hemopoesi. Els factors de creixement produïts per les cèl·lules de l'estroma poden ser, en part retinguts a la membrana citoplasmàtica i en part alliberats a l'espai extracel·lular; no obstant, l'acció majoritària d'aquests factors és local més que sistèmica.

Per altra banda, les cèl·lules de l'estroma s'uneixen a les cèl·lules hemopoètiques a través de molècules o receptors d'adhesió, com ara les integrines, les sel·lectines, les lectines i la superfamília d'immunoglobulines (Taula 1). Es considera que les unions que s'estableixen no impliquen només una localització física sinó que la unió receptor-lligand resultaria també en senyals intracel·lulars que es traduirien en una inducció o inhibició de la proliferació i/o diferenciació cel·lular.

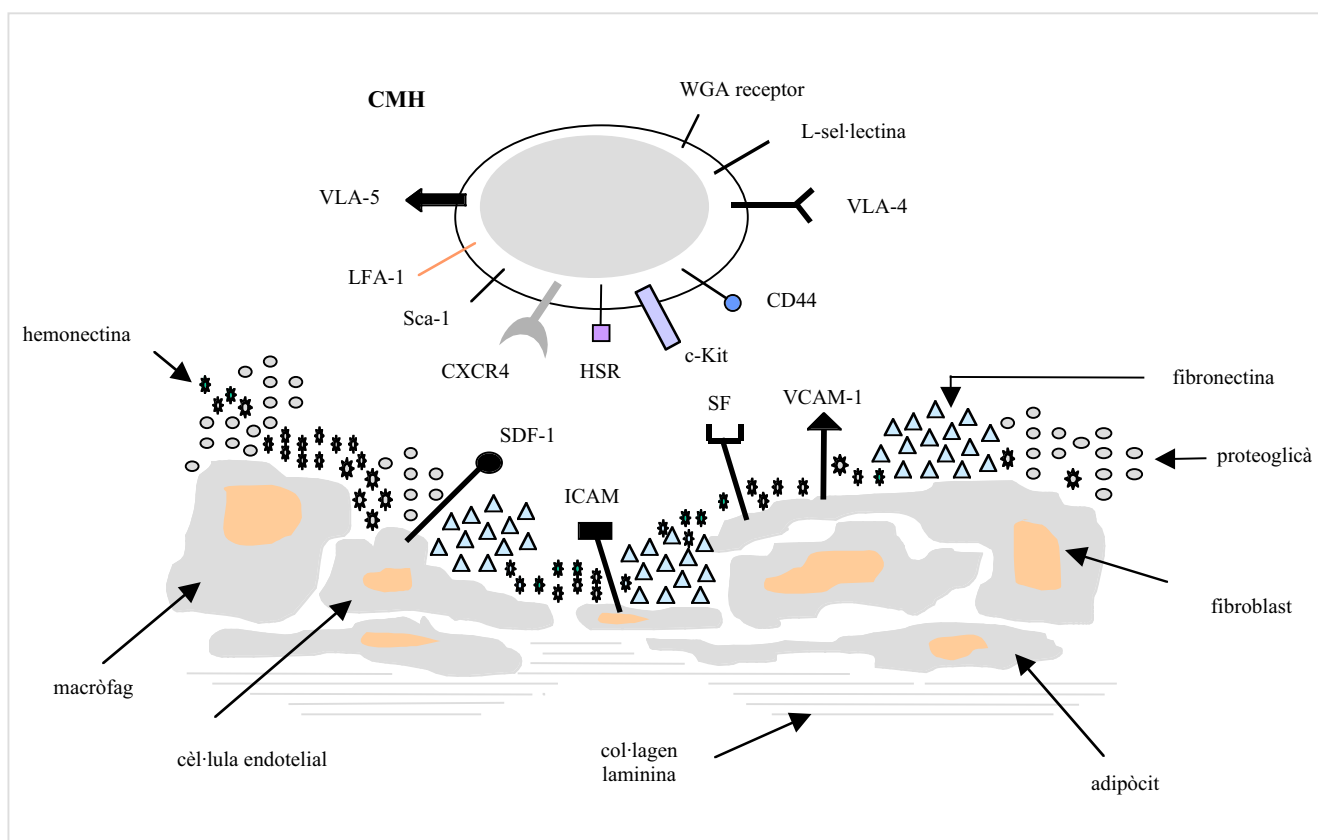
Molècules d'adhesió	Expressió	Lligand
<b>Integrines</b>		
Família $\beta 1$ (CD29)		
VLA-4 ( $\alpha 4\beta 1$ , CD49d)	progenitors, limfòcits, monòcits, cèl·lules plasmàtiques	FN, VCAM-1
VLA-5 ( $\alpha 5\beta 1$ , CD49e)	progenitors, limfòcits, cèl·lules plasmàtiques	FN
Família $\beta 2$ (CD18)		
LFA-1 ( $\alpha L\beta 2$ , CD11a)	leucòcits	ICAM-1, 2 i 3
MAC-1 ( $\alpha M\beta 2$ , CD11b)	monòcits, macròfags, granulòcits	fibrinogen, ICAM-1, HP, C3bi
<b>CD44</b> (Ly24, Pgp-1, ECMIII, HCAM)	progenitors, macròfags, cèl·lules plasmàtiques	col·lagen, FN, hialurònic
<b>Selectines</b>		
E-selectina	cèl·lules endotelials	granulòcits
L-selectina	progenitors, granulòcits, limfòcits, plaquetes	cèl·lules endotelials
P-selectina	cèl·lules endotelials	granulòcits
<b>Família Immunoglobulines-like</b>		
VCAM	cèl·lules endotelials, fibroblast	VLA-4
ICAMs	cèl·lules endotelials, fibroblast	LFA-1
NCAM	cèl·lules estroma, limfòcits T, cèl·lules NK	cèl·lules estroma

**Taula 1.** Molècules d'adhesió presents en les cèl·lules de l'estroma (VLA, *very late antigen*; FN, fibronectina; VCAM, molècula d'adhesió cel·lular vascular; LFA, antígen associat a funció limfocitària; MAC, macròfag; ICAM, molècula d'adhesió intracel·lular; HP, sulfat d'heparan; NCAM; molècula d'adhesió cel·lular neuronal).

### 1.2.3 La matriu extracel·lular

La ME està formada per col·lagen i diferents proteïnes adhesives com per exemple la laminina, la fibronectina i els proteoglicans, els quals desenvolupen funcions conegudes en el microambient medular. Les fibres de col·lagen I i III, per exemple, són secretades pels fibroblasts i formen l'esquelet estructural dels compartiments o nínxols on resideixen les cèl·lules hemopoètiques. La laminina i la fibronectina són molècules grans, multidomini, que contenen el pèptid d'unió universal arginina-glicina-aspartic (RDG). Són les encarregades d'unir les cèl·lules hemopoètiques al col·lagen i de retenir els factors de creixement que dirigiran els processos de diferenciació i proliferació cel·lular.

De manera general es considera que el fet que els progenitors hemopoètics i les cèl·lules mare es puguin unir a components específics de la ME i a les cèl·lules de l'estroma determinaria la seva co-localització amb els factors de creixement associats als mateixos components de la matriu cel·lular, presents en la forma transmembrana en les cèl·lules de l'estroma que els sintetitzen o en la forma soluble, constituint l'hipotètic nínxol hemopoètic (27, 28). El conjunt de senyals intracel·lulars induïts per la interacció dels factors de creixement amb els seus receptors específics i les unions entre les molècules d'adhesió i els seus lligands determinen l'estimulació o la inhibició de la proliferació dels progenitors i CMH en cada moment.



**Fig.3.** Elements que constitueixen el microrambinet medul·lar: cèl·lules de l'estroma (fibroblastes, adipòcits, macròfags, etc) i components de la ME (col·lagen, laminina, fibronectina, hemonectina, etc). A més de ser el suport físic on s'imbrinquen les cèl·lules hemopoètiques, el microambient medul·lar està implicat en la regulació de l'hemopoiesi mitjançant la producció de factors de creixement i les interaccions cèl·lula-cèl·lula que es produeixen entre les molècules d'adhesió (VLA-4, VLA-5, CD44, L-selectina, etc) i els seus lligands (fibronectina, VCAM, col·lagen, laminina, ICAM, etc).

## 2. Factors de creixement hemopoètics

L'hemopoesi és un procés que requereix una sèrie molt complexa d'esdeveniments finament regulats, perquè a partir de la població de cèl·lules mare es generin de manera contínua les cèl·lules madures dels diferents llinatges hemopoètics. Igualment, l'entrada de les cèl·lules madures a la circulació, la localització selectiva als teixits apropiats i la seva activació funcional requereixen un sistema de regulació altament sofisticat. Els factors de creixement hemopoètics i les interaccions cèl·lula-cèl·lula tenen un paper fonamental en aquesta regulació. La resposta de les cèl·lules hemopoètiques als factors de creixement inclou supervivència, proliferació i diferenciació i adquisició o estimulació de la maduració cel·lular.

Els factors de creixement hemopoètics (Taula 2) comprenen una família de glicoproteïnes de baix pes molecular que comprèn els CSF (G-CSF, GM-CSF, M-CSF, l'EPO), les interleucines (IL) (IL-3, IL-1, IL-6), l'SCF, la família de TNF i els IF. Més recentment, s'han inclòs com a factors de creixement hemopoètic la TPO, descrita com un nou factor estimulador de la megacariopoesi, a més que sembla tenir un paper important en la proliferació de les CMH (29, 30); i Flt3-L, que està implicat en els estadis més primitius de l'hemopoesi (31).

Els factors de creixement hemopoètic es poden trobar en forma soluble, transmembrana i associats a diferents elements de la ME. En tots els casos, els factors interaccionen amb receptors de membrana específics presents a les cèl·lules. Aquests receptors s'han classificat en dos grups, segons les homologies estructurals o funcionals: la superfamília de receptors de creixement hemopoètic i la família de receptors amb activitat tirosin-quinasa. Dins el primer grup s'inclouen els receptors per G-CSF, IL-3 (també anomenada multi-CSF), la IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, GM-CSF, EPO, TPO, hormona del creixement (GH), prolactina (PRL) i la proteïna gp130, entre altres. Dins el segon grup s'inclouen els receptors per SCF, M-CSF, factor de creixement derivat de les plaquetes (PDGF) i per Flt3-L. Fora d'aquesta classificació resten els receptors per IL-1 i TNF. Els mecanismes implicats en la transducció del senyal d'aquests factors, després de la unió amb el receptor, són molt variats, i inclouen activitats tirosin-quinasa, unió a proteïnes GTP i activació de la fosfolipasa C, increments d'ATP intracel·lular, sistemes d'ATPases dependents de  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ , etc. Alguns d'aquests receptors s'han trobat també en formes solubles que poden unir igualment lligand i tot just ara es comença a conèixer el seu paper com a reguladors hemopoètics (32).



Una característica comuna als factors de creixement hemopoètic és el seu pleotropisme, és a dir, presenten diferents activitats en diferents cèl·lules diana. Per exemple, els factors de creixement IL-4 o TGF- $\beta$ , tenen efectes estimuladors o inhibidors segons la cèl·lula diana sobre la qual actuen. Igualment, el TNF actua directament com un inhibidor de progenitors hemopoètics i indirectament estimula la producció de factors de creixement estimuladors per cèl·lules accessòries. Les accions sinèrgiques dels factors de creixement també estan ben documentades. Per exemple, quan una població de cèl·lules hemopoètiques multipotents s'exposen únicament a IL-3 o G-CSF no sobreviuen. No obstant, l'acció conjunta dels dos factors fa que proliferin i es diferenciïn en neutròfils i macròfags madurs.

A més, molts dels factors de creixement hemopoètic tenen també activitats fora del sistema hemopoètic. La IL-6 té efectes en el sistema immune, hepàtic i renal i en la prevenció de la mort cel·lular per apoptosi, juntament amb altres factors, com l'IL-3 i l'SCF (33, 34).

<b>Factors de creixement hemopoètics</b>		
<b>factor</b>	<b>localització</b>	<b>cèl·lules que els produeixen</b>
GM-CSF	5q23-31	granulòcits, monòcits/ macròfags, eosinòfils megacariòcits
G-CSF	17q21-22	granulòcits, neutròfils
CSF-1	5q33	macròfags
IL-5	5q31	eosinòfils
Epo	7q11-22	eritròcits, megacariòcits
Tpo	3q26-27	megacariòcits (plaquetes)
IL-3	5q23-31	granulòcits, monòcits/ macròfags, eosinòfils basòfils, mastòcits eritròcits (en presència d'Epo)
SCF	12q22-q24	fibroblastes, cèls reticulars cèl·lules endotelials queratinòcits

**Taula 2.** Factors de creixement, localització cromosòmica i cèl·lules que els produeixen.

Els factors de creixement utilitzats en aquest treball són l'IL-3 i el factor estimulador de cèl·lules mare (SCF), les característiques dels quals es comenten a continuació.

## 2.1. L'SCF

L'SCF, també anomenat factor de creixement de mastòcits o lligand de c-Kit, exerceix els seus efectes biològics a través de la unió amb el seu receptor, anomenat c-Kit (35). El produeixen les cèl·lules de l'estroma i és sintetitzat alhora en forma soluble i com a component integral de membrana. És codificat pel locus S1 en el cromosoma 10 de ratolí i ha estat mapat al cromosoma 12q22-q24 en humans. El receptor c-kit és codificat pel locus W i es caracteritza per tenir un domini intracel·lular amb activitat tirosin-quinasa. Quan l'SCF s'uneix al receptor, aquest s'homodimeritza i s'autofosforila. La fosforilació generada crea llocs d'unió per a diferents proteïnes amb dominis SH2, les quals constitueixen el primer esglaó en la via de transducció del senyal d'aquest factor. És sintetitzat de manera constitutiva per les cèl·lules endotelials i fibroblàstiques, a més, també en sintetitzen les cèl·lules epitelials de l'intestí i els queratinòcits.

L'SCF té un paper important durant el desenvolupament embrionari, amb efectes sobre l'hemopoesi i el desenvolupament i migració de les cèl·lules germinals i dels melanòcits. Addicionalment, també té un paper fonamental en la vida adulta en el manteniment de l'hemopoesi basal, entre altres funcions. El tractament de ratolins adults amb un anticòs anti-c-kit disminueix significativament la cel·lularitat del MO, indicant que l'interacció del factor amb el seu receptor és necessària pel manteniment de l'equilibri del sistema hemopoètic. S'ha demostrat que l'SCF actua directament sobre les CMH accelerant-ne l'entrada en cicle cel·lular (15, 36). És capaç de promoure la supervivència *in vitro* de cèl·lules mare murines (37). Ara bé, aquestes cèl·lules sobreviuen en presència d'un anticòs anti-c-kit, cosa que suggereix que els altres factors de creixement produïts per les cèl·lules estromàtiques del cultiu són capaços de mantenir la supervivència de les cèl·lules mare en absència d'SCF (38). Sobre els progenitors hemopoètics més madurs, l'SCF té un important efecte sinèrgic amb altres citocines, entre elles l'IL-3, per estimular el creixement de colònies (uni, bi i multipotents) en medis semisòlids. Pel que fa als seus efectes *in vivo*, tant en ratolins com en primats, l'administració d'SCF resulta en una mobilització dels progenitors primitius del MO a SP i en un increment del número de progenitors circulants (39, 40).

## 2.2. L'IL-3

L'IL-3 murina és una glicoproteïna d'un pes molecular d'entre 14 a 28 KD. Tansols presenta una homologia de seqüència aminoacídica d'un 29 % amb l'IL-3 humana. El receptor de l'IL-3 pertany a la família de receptors de creixement hemopoètic. La producció majoritària d'IL-3 és per part dels granulòcits, monòcits, les cèl·lules NK i els mastòcits (41).

*In vitro*, l'IL-3 estimula la proliferació d'un ampli espectre de cèl·lules en diferents estadis de la diferenciació hemopoètica, tant de cèl·lules mare multipotents com progenitors llinatge-compromesos. Té un efecte fonamental en la proliferació de progenitors multipotents però només d'aquells que haurien sortit de la fase G<sub>0</sub> del cicle cel·lular. No obstant, la sortida de la fase G<sub>0</sub> i entrada en cicle de les cèl·lules mare i progenitors més primitius ve determinada per l'acció conjunta de varis factors de creixement (sinergisme), com ara l'SCF, IL-11, IL-6 i G-CSF, Flt3-L i TPO (20).

Sobre els estadis terminals de l'hemopoesi l'IL-3 tindria un paper més modest. Hi ha varis estudis que indiquen que els progenitors multipotents murins i humans perden la sensibilitat a la citocina a mesura que es diferencien i maduren (42, 43).

Alguns treballs suggereixen que la presència d'IL-3 en el conjunt de factors de creixement utilitzats per l'expansió de les cèl·lules hemopoètiques disminueix la seva capacitat de repoblació a llarg termini (44, 45).

## 3. La nidificació de les CMH al MO

Una característica de la CMH més primitiva és la capacitat de repoblació a llarg termini de tots els llinatges hemopoètics després d'un trasplantament a hostes mielosuprimits o immunocompromesos. El procés pel qual els progenitors hemopoètics colonitzen el microambient medular després d'un trasplantament, a través d'un seguit de mecanismes d'adhesió s'anomena nidificació. Existeixen una gran varietat de molècules o receptors d'adhesió, i altres lligands responsables de les interaccions cèl·lula-cèl·lula o cèl·lula matriu, com ara les sel·lectines i les integrines (Taula 1, pàgina 9). No obstant, l'associació entre els diferents factors de creixement els diferents tipus de cèl·lules i components de la ME que constitueixen el microambient del MO, encara és un camp d'estudi molt recent.

L'article de Frenette i col va representar una gran contribució en l'estudi de la nidificació de la CMH al MO (46). Aquests autors demostraren la implicació directa de la P i L-sel·lectines i de la integrina VLA-4 com a receptors crítics de la nidificació, ja que observaren una supervivència molt baixa en ratolins irradiats deficients en P- i L-sel·lectines trasplantats amb MO, en comparació amb els ratolins salvatges. Altres grups també demostraren una davallada de l'empelt hemopoètic quan les cèl·lules havien estat prèviament incubades amb anticossos anti-VLA-4 o quan els receptors s'havien injectat amb anticossos anti-VCAM-1 (7) o/i anti-CD44 (9).

Recentment, s'ha establert una relació directa entre el receptor per SDF-1 (stromal derived factor-1), el CXCR4, present a les cèl·lules CD34<sup>+</sup> humanes (on s'inclouen les CMH) i la seva capacitat d'empeltar en ratolins immunodeficients NOD/SCID (47, 48). Sembla ser que l'activació del receptor CXCR4 a les cèl·lules CD34<sup>+</sup> per acció de l'SDF-1 permetria una adhesió i posterior migració transendotelial de les cèl·lules, la qual seria dependent de LFA-1/ICAM-1 i VLA-4/VCAM-1. Posteriorment, s'induiria l'extravasació i migració de les cèl·lules CD34<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup> a través de la ME. Aquest estadi seria dependent de la unió de les integrines VLA-4 i VLA-5 a la fibronectina de la ME (49).

Estudis addicionals amb progenitors murins, demostren que quan les CMH són cultivades amb factors de creixement, prèviament al trasplantament de receptors irradiats letalment, disminueix considerablement la capacitat de nidificació en comparació amb els progenitors frescs (50, 51). Quesenberry presenta resultats similars perquè demostra que canvis en la fase del cicle cel·lular de la CMH induïts per l'exposició *ex vivo* a citocines podria, en part, explicar el decreixement de l'empelt observat *in vivo* (52). En un altre treball posterior del mateix grup, estudien que canvis en l'expressió dels receptors d'adhesió (VLA-4, VLA-5, PECAM, L-sel·lectina) i en la seva funció (adhesió a l'estroma) després de l'incubació de cèl·lules de MO murines amb citocines són crítics per la nidificació i posterior empelt de la cèl·lula mare després del trasplantament (53).

En resum, aquest camp emergent suggereix un complex número d'interaccions responsables de la migració, moviment i nidificació de les CMH. Els detalls que defineixen quines molècules i quines poblacions cel·lulars hi participen és un camp de recerca molt interessant sobretot per la seva aplicació en les àrees clíniques de la teràpia gènica i el trasplantament de cèl·lules hemopoètiques.

#### 4. Estudi de les CMH murines

La dissecció del compartiment de CMH i l'aïllament de les diferents subpoblacions de cèl·lules mare té moltes utilitats. Per exemple, permet als investigadors obtenir informació bàsica sobre el fenotip i els factors de creixement requerits per cada subpoblació de cèl·lules i de les seves capacitats de repoblació *in vitro* i *in vivo*. Per altra banda, les subpoblacions de progenitors purificats s'utilitzen per trobar les condicions òptimes de manipulació *ex vivo* de les CMH sense que es perdin les seves propietats d'autorenovació i repoblació a llarg termini. Les manipulacions inclouen la purificació de les cèl·lules mare, l'emmagatzematge i la seva utilització en teràpia gènica, entre altres.

##### 4.1. Caracterització fenotípica de les CMH murines

L'anàlisi fenotípica de la població de cèl·lules mare ha resultat especialment complex a causa de la baixa representativitat en el total del MO i especialment a causa de la seva elevada heterogeneïtat. Nombrosos treballs han descrit diferents mètodes per l'enriquiment de CMH murines, basant-se en diferents criteris d'anàlisi:

- i) Resistència a fàrmacs, com el 5-fluorouracil (5-FU).
- ii) Separació per mida i gradient de densitat (elutriació) (54).
- iii) Capacitat d'unió a lectines com ara l'aglutinina de la llavor del blat, WGA (55).
- iv) Extrusió de colorants com la Rho-123 (56) o el Hoescht 33342 (57). Les cèl·lules més primitives es caracteritzen pel fet d'acumular menys Rho-123 (colorant que té elevada afinitat per la membrana mitocondrial) i Hoescht 33342 (colorant que té afinitat elevada per la membrana plasmàtica) que les cèl·lules més diferenciades.
- v) Selecció positiva o negativa atenent a l'expressió de diferents antígens de membrana (veure apartat 4.1.1).

A causa de la capacitat demostrada del 5-FU en el pre-tractament de les cèl·lules expandides pel trasplantament i per la transducció retrovívica, tots els experiments *in vivo* d'aquest treball s'han fet utilitzant cèl·lules de MO pre-tractades amb 5-FU. Aquest fàrmac elimina selectivament les cèl·lules en divisió. La capacitat dels progenitors hemopoètics més immadurs per resistir els efectes tòxics del 5-FU vindria donada pel seu estat normalment quiescent (5). Varis treballs demostren com les cèl·lules primitives murines amb capacitat de repoblació a llarg termini (LTR) són estimulades ràpidament a proliferar, amb un pic màxim de 3 a 5 dies després de l'administració d'una dosi única (150 mg/Kg) de 5-FU (14). Amb

aquest tractament s'aconsegueix concentrar 10 vegades la població de CMH sense causar-les-hi cap deteriorament aparent (58). A més, també s'ha demostrat que el tractament dels ratolins donants amb 5-FU és necessari si es vol obtenir una elevada eficiència de transducció a les cèl·lules murines amb capacitat LTR (59). Per aquesta raó, s'utilitza el 5-FU en la majoria d'estudis on es vol aconseguir concentrar CMH murines per posteriorment transduïr-les amb diverses finalitats.

L'aplicació conjunta de diversos dels criteris comentats en combinació amb la separació cel·lular mitjançant citometria de flux o *fluorescent activated cell sorting* (FACS) és el que ha possibilitat l'obtenció de les poblacions cel·lulars més enriquides en CMH.

En l'estudi de l'hemopoesi, l'obtenció de poblacions cel·lulars funcionalment reconegudes com a cèl·lules mare ha estat rellevant no només dins el camp de la investigació bàsica sinó també en l'aplicació clínica. La possibilitat d'enriquir la població de cèl·lules mare ha permès analitzar d'una manera directa la regulació de la seva diferenciació i proliferació, l'expressió de receptors pels factors de creixement o l'expressió de gens importants implicats en l'hemopoesi. Igualment, el fet de poder purificar les CMH humanes ha facilitat la seva utilització en el marcatge i teràpia gènica.

#### 4.1.1. Marcadors de membrana presents a les cèl·lules hemopoètiques murines

No s'ha descrit cap marcador de membrana restringit exclusivament a la CMH murina. La caracterització fenotípica i la purificació d'aquestes cèl·lules no s'ha aconseguit a partir d'un únic marcador sinó de la combinació de diferents marcadors que, si bé s'expressen en altres tipus cel·lulars, només es co-expressen o estan absents en les cèl·lules mare més primitives. Un dels treballs més significatius dins la caracterització fenotípica de les cèl·lules mare murines ha estat el del d'Spangrude i col. Mitjançant FACS van caracteritzar una població cel·lular de MO negativa per antigens propis de cèl·lules madures (Mac-1, Gr-1, CD4, CD8, B220 i TER-119), que expressava l'antigen Sca-1 i poc positiva (o *low*) per l'antigen Thy-1 (present en timòcits), és a dir, Lin<sup>-</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, Thy-1<sup>-/low</sup> (60). Varen demostrar que amb només 30 cèl·lules del MO amb aquest fenotip (Lin<sup>-</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, Thy-1<sup>-/low</sup>) aconseguien la supervivència del 50% dels receptors i la seva reconstitució hemopoètica a llarg termini. Ploemacher i col introdueixen la depleció immunomagnètica de les cèl·lules del MO mitjançant un anticòs que reconeix les cèl·lules granulo-monocítiques madures i posteriorment les separa per FACS en diferents fraccions en base a l'afinitat per WGA (WGA<sup>dim</sup> WGA<sup>medium</sup> WGA<sup>bright</sup>) (55). Observen que la majoria de progenitors més immadurs

es concentren a la fracció WGA<sup>dim</sup>, mentre que la fracció WGA<sup>bright</sup> es troba enriquida en progenitors més madurs. Un altre marcador utilitzat per definir les cèl·lules mare murines és el receptor c-kit (61). Aquest receptor s'expressa al 70-80 % de les cèl·lules Lin<sup>-</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, Thy-1<sup>-/low</sup> i l'activitat repobladora a llarg termini es concentra a la fracció c-kit<sup>+</sup> (62). Finalment, en un estudi recent, utilitzant el FACS i treballant amb quatre colors, Osawa i col demostren que la majoria de cèl·lules murines amb capacitat LTR són CD34<sup>-</sup> (63). El seu anàleg humà s'expressa en progenitors hemopoètics immadurs (CD34<sup>+</sup>) i és àmpliament utilitzat per l'enriquiment d'aquests progenitors mitjançant selecció positiva. No obstant, igual que en el model murí, varis grups han demostrat que una fracció de cèl·lules CD34<sup>-</sup> humanes té activitat LTR i podrien ser més primitives que les cèl·lules CD34<sup>+</sup> (64). Randall i col (65) demostren que les cèl·lules murines amb capacitat LTR expressen l'antigen CD38.

L'última aportació en la caracterització fenotípica de les CMH és el treball del grup d'Anderson (66). Utilitzant el FACS i treballant amb 5 colors, aïllen una població de cèl·lules murines amb fenotip Lin<sup>-</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, c-kit<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup> que compleix tots els requisits de CMH. No obstant, demostren mitjançant un experiment de repoblació competitiva que perquè esdevingui una ràpida proliferació d'aquestes cèl·lules després d'un trasplantament de MO es requereix la infusió conjunta amb una altra població accessòria amb fenotip Lin<sup>-</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, c-kit<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> CD34<sup>+</sup>.

## 4.2. Assaigs funcionals per cèl·lules hemopoètiques primitives

Actualment, la definició de CMH és la d'una cèl·lula amb capacitat d'autorenovació i que doni lloc a repoblació de tots els llinatges hemopoètics després de la infusió en un receptor condicionat.

Les diferents subpoblacions de progenitors i cèl·lules mare s'han identificat i classificat en característiques funcionals i fenotípiques. Dins les característiques funcionals, trobem la capacitat de formar *clusters* o colònies de cèl·lules *in vitro* i l'activitat repobladora del sistema hemopoètic a curt o llarg termini en un receptor condicionat.

### 4.2.1. Caracterització mitjançant cultius *in vitro* dels progenitors hemopoètics

Una de les característiques funcionals dels progenitors hemopoètics és que en resposta a factors de creixement presents en medis de cultiu semifluid (metilcel·lulosa, agar) proliferen i formen colònies de cèl·lules diferenciades. Cada colònia resulta a partir de la proliferació d'una única cèl·lula, de manera que cada tipus de progenitor hemopoètic dona lloc a un tipus concret de colònia. De manera general, les colònies generades per un conjunt

de cèl·lules hemopoètiques es poden classificar segons la morfologia de les cèl·lules, la mida de la colònia i el número de cèl·lules que la formen. La presència de cèl·lules d'un, dos o més llinatges cel·lulars dins una mateixa colònia determina la seva classificació com a colònia monopotent, bipotent o multipotent, una característica que reflexa la capacitat de diferenciació del progenitor que l'ha generat. Així doncs trobem colònies amb elevat potencial proliferatiu (HPP-CFC), generades per un progenitor altament immadur; i colònies amb baix potencial proliferatiu (LPP-CFC), generades per progenitors més compromesos cap a un (per exemple les cèl·lules o unitats formadores de colònies d'eritròcits o CFU-E, o de granulòcits, CFU-G) o varis llinatges (per exemple, les cèl·lules formadores de colònies de granulòcits i monòcits o CFU-GM)

Encara no s'ha establert un assaig *in vitro* capaç de detectar CMH, la quantificació i detecció de les quals només es considera a partir de l'assaig *in vivo* que determina la capacitat LTR, tal i com es comenta a l'apartat següent.

#### **4.2.2. Determinació de la capacitat de les CMH de repoblació a curt (STRA) i a llarg termini (LTRA): assaig reconstitució a curt i llarg termini i assaig de repoblació competitiva**

Actualment, s'accepta que les CMH han de ser capaces de reconstruir a llarg termini el sistema hemopoètic de receptors irradiats letalment. Aquesta capacitat implica que les cèl·lules mare trasplantades siguin capaces d'autorenovar-se, per mantenir el suplement de progenitors a llarg termini, i diferenciar-se per produir els diferents tipus de cèl·lules hemopoètiques madures. En el model murí, la presència de cèl·lules sanguínies del donant de tots els llinatges 4 mesos després del trasplantament es considera prova suficient per afirmar que la població trasplantada conté cèl·lules amb capacitat LTR, és a dir, amb característiques de CMH (67).

Per avaluar la capacitat LTR de les cèl·lules trasplantades a receptors irradiats letalment, s'utilitzen els assaigs de reconstitució i/o repoblació competitiva. Ambdós assaigs es basen en què la dosi de radiació administrada impossibilita la regeneració del teixit hemopoètic a partir de les cèl·lules mare endògenes. Així doncs, quan s'irradia el ratolí, si no és trasplantat amb cèl·lules hemopoètiques exògenes, mor per síndrome hematològica durant els primers 30 dies post-irradiació (pàgina 28).



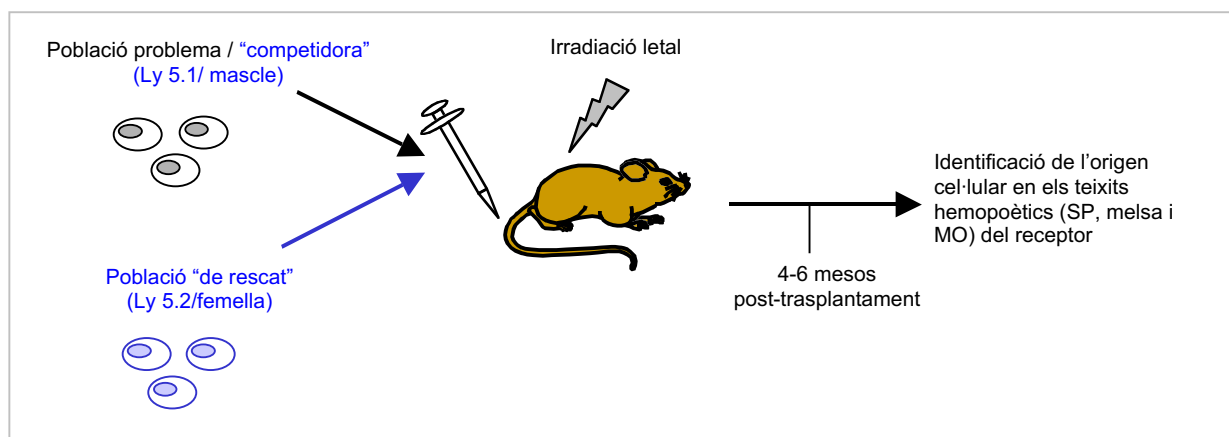
En canvi, quan el ratolí és trasplantat:

- i) Si les cèl·lules hemopoètiques inoculades li permeten sobreviure durant els primers 30 dies post-irradiació, es considera que les cèl·lules trasplantades tenen capacitat de reconstitució de l'hemopoesi a curt termini (STRA).
- ii) En aquestes mateixes condicions, si el ratolí sobreviu fins un mínim de 4-6 mesos post-trasplantament es parla de reconstitució hemopoètica a llarg termini (LTRA). En tot cas, per confirmar la capacitat de reconstitució a llarg termini de les cèl·lules trasplantades cal demostrar que les cèl·lules hemopoètiques presents a la SP dels receptors als 4 mesos del trasplantament procedeixen del donant (total o parcialment). En cas contrari, el sistema hemopoètic del receptor hauria estat reconstruït a partir de cèl·lules endògenes que haurien sobreviscut a l'irradiació.

Les cèl·lules progenitores hemopoètiques del MO murí presenten una elevada heterogeneïtat en la capacitat i activitat proliferativa. Des de principis dels 90 s'ha establert l'existència de dues poblacions que poden ser discriminades en progenitors immadurs relativament compromesos que formarien colònies *in vitro* i tindrien capacitat de repoblació a curt termini (STRA) i CMH amb capacitat repobladora a llarg termini (LTRA) (54, 55, 68, 69).

Les cèl·lules amb STRA només tenen capacitat de repoblar el sistema hemopoètic d'un receptor irradiat les primeres setmanes post-trasplantament (54, 55). Inicialment, es va considerar que l'assaig de radioprotecció, el qual implica únicament el recompte de ratolins trasplantats que sobreviuen a la irradiació letal al cap de 30 dies, era vàlid per la identificació de les CMH, ja que, el rescat de la mort hematològica radioinduïda comportava necessàriament un progenitor totipotent capaç de diferenciar-se en cèl·lules limfoides i mieloides. No obstant, més endavant es va demostrar que la capacitat de radioprotecció no sempre anava associada amb una posterior reconstitució a llarg termini (60). Perquè hi hagi reconstitució a llarg termini, les cèl·lules amb capacitat LTR s'han de trasplantar conjuntament amb cèl·lules STR perquè l'hoste irradiat letalment pugui sobreviure a la fase inicial d'aplàsia (54).

L'assaig de reconstitució a llarg termini ha resultat fins el moment la definició funcional més estricta de les CMH. No obstant, alguns autors consideren que la millor estratègia per analitzar i quantificar la població de cèl·lules mare és l'assaig de repoblació competitiva, que és una modificació de l'assaig LTR (5, 70). Aquests autors postulen que poblacions molt pures de cèl·lules mare trasplantades són incapaces de protegir de la irradiació als ratolins, en canvi si tenen capacitat de reconstitució a llarg termini. Per solucionar l'incapacitat d'empelt a curt termini, l'assaig de repoblació competitiva contempla el trasplantament del receptor amb dos poblacions cel·lulars diferents: una població singènica amb el receptor (població accessòria o de rescat) destinada a garantir la supervivència i reconstitució hemopoètica a curt termini dels receptors i una població "competidora" problema, genètica o fenotípicament diferenciable de la de rescat, de la qual s'avaluarà la capacitat de reconstitució a llarg termini (Fig.4).



**Fig.4.** Anàlisi de la capacitat LTR d'una població cel·lular determinada mitjançant l'assaig de repoblació a llarg termini. En blau s'observen les característiques addicionals de l'assaig de repoblació competitiva.

## II. *Biologia del TMO*

### 5. **Trasplantament del moll de l'os. Del passat al present.**

Han passat 50 anys des dels primers experiments de trasplantament de cèl·lules hemopoètiques (TCH). Gràcies als estudis experimentals amb ratolins, gossos i primats no humans s'han solucionat molts dels problemes del TCH, tant és així, que actualment es realitzen més de 20.000 trasplantaments anuals arreu del món. Inicialment, el trasplantament només s'aplicava a pacients oncològics, i actualment s'aplica a malalties genètiques del sistema hemopoètic. Encara que en estadi experimental, s'està ampliant la seva aplicació cap a les malalties autoimmunitàries, els "minitrasplantaments" (pàgina 33) i el desenvolupament de tècniques per induir tolerància per l'empelt d'òrgans sòlids.

La història del trasplantament de MO (TMO) comença el 1949 amb els estudis de dos patòlegs (Jacobson i Lorenz) els quals observaren que preservant la melsa d'un ratolí de la irradiació letal, sobrevivia i; que els ratolins irradiats podrien sobreviure amb una infusió de cèl·lules de la melsa o del MO.

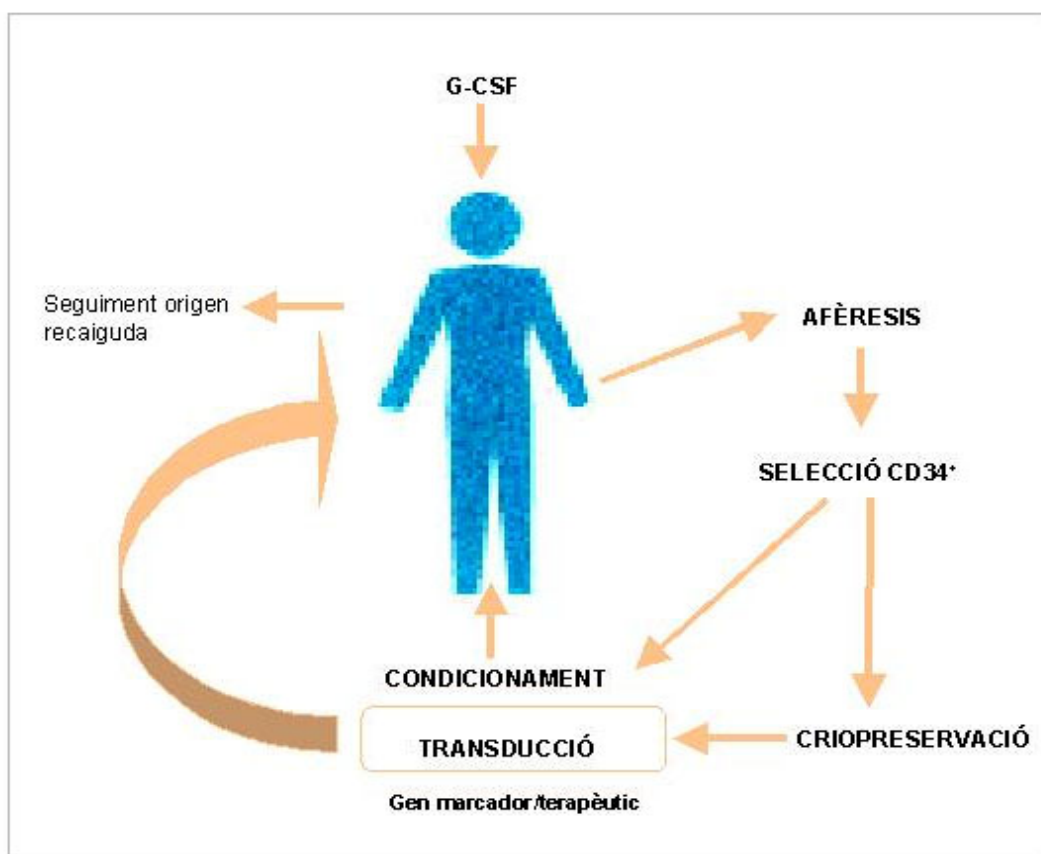
Els primers estudis realitzats en el model murí establiren molts dels factors responsables de l'èxit o fallida del TMO al·logènic (pàgina 24). Les aportacions més interessants han estat (71):

- i) Les cèl·lules de MO administrades intravenosament són efectives en la repoblació hemopoètica de receptors sotmesos a irradiació letal.
- i) Les cèl·lules T del donant trasplantades poden desencadenar una resposta immunològica contra els teixits de l'hoste. Fet que és conegut com la malaltia de l'empelt contra l'hoste o, en anglès, *graft versus host disease* (GVHD).
- ii) En els trasplantaments al·logènics la severitat de la resposta immune de les cèl·lules del donant és controlada per factors genètics (sistema d'histocompatibilitat) i cel·lulars (cèl·lules T).
- iii) La importància del timus, les cèl·lules T i B i altres poblacions limfoides en la biologia del trasplantament.

El model caní també ha estat molt útil en l'estudi del TCH sobretot en l'estudi dels principis i les tècniques del trasplantament que són aplicables als humans. Els treballs amb gossos realitzats a Seattle durant varies dècades han estat bàsics per l'estudi de règims mieloablatius i immunosupressors per aconseguir l'empelt de cèl·lules hemopoètiques al·logèniques i prevenir el GVHD. Una avantatge d'aquest model és que es poden obtenir un gran nombre d'animals histocompatibles. A més, el model caní és més proper a l'home que el murí. És necessària la utilització de models animals per continuar la recerca experimental en

el camp del TCH ja que existeixen diverses disciplines dins aquest camp que s'aprofitarien dels resultats, com ara la radiobiologia, l'hematologia i la immunologia.

Els primers estudis de trasplantament en humans utilitzaven MO com a font de CMH. Més endavant, es va demostrar que les cèl·lules CD34<sup>+</sup> humanes obtingudes de MO estaven enriquides en progenitors hemopoètics i eren efectives en els TCH (72). La utilització d'una població enriquida en progenitors hemopoètics CD34<sup>+</sup> procedents de fonts diferents al MO (en primer lloc de SP i posteriorment sang de cordó umbilical -SCU-) ha causat el canvi en la terminologia de TMO a TCH. Les CMH humanes poden ser purificades i separades en base a l'expressió de l'antigen CD34<sup>+</sup> a partir de SP (mobilitzada mitjançant l'administració de factors de creixement i/o quimioteràpia), MO o SCU.



**Fig.5.** Exemple de protocol per l'estudi de la possible contribució de les cèl·lules trasplantades en la recaiguda.

## 5.1. Tipus de TCH

En termes generals, el principal objectiu d'un trasplantament és reconstituir l'hemopoesi del pacient que ha estat sotmès a un tractament excessivament tòxic pel seu propi sistema hemopoètic. El TCH es classifica segons el tipus de donant en: autòleg (autogènic), isogènic (singènic), al·logènic i xenogènic. El trasplantament al·logènic (al·loTCH) es basa en la substitució de les cèl·lules hemopoètiques de l'individu malalt amb cèl·lules d'un individu de la mateixa espècie, emparentat (habitualment un germà histocompatible) o no. L'al·loTCH constitueix, en molts casos, l'única opció en algunes malalties (leucèmies, anèmia aplàstica, malalties genètiques). No obstant, les pautes que s'utilitzen com condicionament convencional en els TCH (bàsicament ICT i ciclofosfamida) per tal d'immunosuprimir i eradicar les cèl·lules malignes són mal tolerades i, en gran part, responsables de la mortalitat precoç relacionada amb el TCH, sobretot en pacients d'edat avançada, pacients que han presentat una toxicitat intensa amb la quimioteràpia convencional o bé pacients que ja han estat trasplantats prèviament. El trasplantament autòleg o autoTCH és el més utilitzat en la majoria de malalties hematològiques o malignes. Té menys complicacions post-trasplantament ja que l'empelt autòleg és més ràpid que l'al·loTCH i no s'esdevé GVHD. En aquest cas no fa falta l'immunosupressió, però té el risc de reintroduir cèl·lules malignes, ja que les cèl·lules que es reinfonen són les del mateix pacient. El risc de recaiguda del trasplantament autòleg també és més elevat degut a l'absència de l'efecte de GVL (la cel·lularitat immunocompetent derivada de l'empelt té efecte antitumoral), que si tenen els al·loTCH. El TCH isogènic o isoTCH, té lloc entre bessons genèticament idèntics o univitelins (2% del total dels trasplantaments). Quan el donant és d'una altra espècie parlem d'un trasplantament xenogènic.

## 5.2. Quimerisme. Models experimentals per l'estudi del quimerisme hematològic

El terme quimera deriva d'una criatura de la mitologia grega (*chímaira*) que escopia foc, tenia cap de lleó, cua de serp i cos de cabra. En biologia, una quimera es defineix com un organisme que té poblacions cel·lulars d'individus diferents. En genètica, una quimera és un individu que és portador de caràcters propis de 2 genotips diferents. En el camp de la radiobiologia i el trasplantament s'utilitza el terme quimera per descriure un organisme (receptor) el sistema hemopoètic del qual deriva parcial (quimera mixta) o totalment (quimera completa) d'un altre individu donant. El terme quimera diferencial s'utilitza per indicar els nivells d'empelt a les diferents poblacions cel·lulars hemopoètiques (limfòcits B, cèl·lules T, macròfags, eritròcits) d'un individu trasplantat. La primera descripció de quimerisme rau del 1945 (73).

Existeixen diverses tècniques per la detecció i quantificació del quimerisme, les quals utilitzen marcadors citogenètics, bioquímics i immunològics.

El primer mètode per la identificació de cèl·lules del donant al receptor trasplantat rau al 1956. Es realitzava un examen citològic de les metafases per analitzar la presència del marcador T6 (translocació cromosòmica induïda per irradiació entre els cromosomes 14 i 15) present a les cèl·lules del donant. Es tractava d'una tècnica molt laboriosa i a més, podria ser que la anormalitat cromosòmica conferís un desavantatge competitiu respecte les cèl·lules normals.

Un mètode molt més recent per analitzar quimerisme es basa en la detecció de les cèl·lules del donant a MO de receptors histocompatibles però de sexe contrari mitjançant la detecció del cromosoma Y per hibridació *in situ* (55) o bé mitjançant PCR de seqüències específiques del cromosoma Y o bé mitjançant *Southern blot* (74). No obstant, podria existir el problema del rebuig de les cèl·lules del mascle (antígens codificats pel cromosoma Y) per part de les femelles.

També s'han utilitzat animals transgènics per monitoritzar l'empelt a ratolins trasplantats. Les seqüències d'ADN introduïdes al genoma dels ratolins transgènics serveixen com a marcadors genètics per detectar les cèl·lules del donant repobladores. No obstant aquesta tècnica té una limitació, només es pot utilitzar per a mesurar empelt de cèl·lules nucleades, excloent la possibilitat de monitoritzar el quimerisme als eritròcits.

Els marcadors bioquímics més utilitzats es basen en la detecció de diferències enzimàtiques en l'anhidrasa carbònica (AC) o en les formes murines de l'enzim glicolític fosfoglicerat quinasa (PGK) o la glucosa fosfat isomerasa (GPI), o bé en la detecció de polimorfismes de l'hemoglobina (Hb); en totes les situacions les diferències seran revelades per electroforesis. L'AC i l'Hb, són dues proteïnes específiques dels eritròcits per tant, no es podran utilitzar per mesurar empelt als altres llinatges hemopoètics. Els enzims PGK i GPI, s'expressen a tots els llinatges hemopoètics (75).

Els marcadors immunològics utilitzen diferències en els antígens de membrana cel·lular entre donant i receptor, que són detectats mitjançant anticossos monoclonals. L'anàlisi per citometria de flux dels antígens de membrana CD45.2 i CD45.1 (isoenzims) es va desenvolupar com un mètode per detectar quimeres a llarg termini entre soques de ratolins congènics que presenten diferències al·lèliques en l'expressió de les molècules de superfície CD45.1 i CD45.2 (originalment, Ly 5.2 i Ly 5.1, respectivament) (76).

Les soques de ratolins utilitzades en aquest treball, B6.SJL-*Ptprc<sup>a</sup>Pep3<sup>b</sup>*/BoyJ (CD45.1) i C57BL/6J (CD45.2) són MHC idèntiques, es diferencien en el locus Ly5 (CD45), localitzat al cromosoma 1. Es tracta d'un antigen diferencial de cèl·lules nucleades que presenta dues formes proteiques que pertanyen a una família d'enzims reguladors del creixement cel·lular: un receptor de tipus C amb activitat tirosina fosfatasa (*Ptprc<sup>a</sup>*) i la peptidasa 3 (*Pep3<sup>b</sup>*). Actualment és un dels models animals més utilitzat en estudis de trasplantament isogènic. L'únic inconvenient que presenta és que la proteïna CD45 i els seus respectius isoenzims només s'expressen en les cèl·lules nucleades (60). Per tant, no es pot mesurar el quimerisme a la sèrie eritroide.

El marcatge retroviral de les cèl·lules hemopoètiques del donant també s'ha utilitzat per avaluar el quimerisme, entre altres aspectes (veure apartat 9, Introducció). Tenint en compte que el marcador retroviral s'integra aleatòriament a l'ADN, es podrà analitzar la clonalitat de la progènie derivada d'una cèl·lula progenitora marcada inicialment. La presència de cèl·lules madures de tots els llinatges hemopoètics portadors d'una forma proviral al mateix lloc d'integració cromosòmica demostra que la cèl·lula inicialment marcada tenia capacitat multilinatge. La tècnica del marcatge retroviral té el desavantatge que només es podran estudiar els clons infectats i teòricament no tenen perquè representar la totalitat de la població de cèl·lules repobladores del donant.

## 6. Dany hemopoètic induït per les radiacions ionitzants

A l'àmbit de la radioteràpia les radiacions més utilitzades són l'electromagnètica i les fonts d'electrons accelerats. L'electromagnètica es caracteritza perquè el fotó incident té energia suficient per "arrancar" un electró de l'estructura atòmica i sortir amb una energia inferior. El resultat és la formació d'ions altament reactius que es transformen en radicals lliures. Aquests últims són els responsables directes de la major part del dany biològic produït per les radiacions, juntament amb la formació de peròxid d'hidrogen en presència d'oxigen molecular. Les fonts d'electrons accelerats s'utilitzen menys, són partícules atòmiques carregades negativament i amb una massa molt petita. Quan són d'origen natural (desintegracions) s'anomenen partícules  $\beta$ .

Atès que en la composició de l'ésser viu el 60-90% és aigua, la importància que té la ionització d'aquesta és bàsica. Aproximadament el 50% dels efectes biològics de les radiacions seran conseqüència de la ionització de l'aigua (efecte indirecte), i l'altra meitat seran efectes directes; és a dir, derivats de la ionització directa d'altres molècules.

En general, les poblacions cel·lulars sotmeses a una irradiació poden patir els fenòmens següents: retard en la divisió cel·lular, mort mitòtica i mort intermitòtica, de menys a més dosi de radiació rebuda. Des del punt de vista radiobiològic, a banda de les múltiples alteracions en la fisiologia de la cèl·lula que puguin generar les radiacions, la lesió es considera letal només quan la cèl·lula perd la seva capacitat per proliferar. Partint d'aquest criteri, el concepte de radiosensibilitat cel·lular representa la probabilitat que la cèl·lula mori quan intenti dividir-se, independentment del temps que trigui per fer-ho. Les corbes de supervivència representen una eina per comparar la radiosensibilitat de les diferents poblacions cel·lulars. S'hi descriu la relació entre la dosi d'irradiació administrada i la fracció de cèl·lules que sobreviuen (mantenen la seva capacitat proliferativa).

Igualment, si bé el dany sobre el teixit no pot ser mesurat en termes de supervivència cel·lular, sí que pot ser expressat com una pèrdua de la seva funció. De manera general, la radiosensibilitat dels teixits és directament proporcional al grau d'activitat proliferativa i inversament proporcional al grau de diferenciació. És a dir, dins d'un teixit, les cèl·lules diferenciades, amb activitat mitòtica nul·la o escassa, són més radioresistents que les cèl·lules indiferenciades en proliferació activa. Aquest fet és evident en el teixit hemopoètic (77, 78), on els progenitors més indiferenciats són els més resistents i a mesura que es diferencien són més radiosensibles.

El teixit hemopoètic es caracteritza per tenir una radioresposta (temps que triga la cèl·lula a manifestar les alteracions induïdes per la irradiació) ràpida, és a dir, expressa a curt termini els efectes tòxics de la irradiació.

Les corbes de supervivència representen una eina per comparar la radiosensibilitat de les diferents poblacions cel·lulars. S'hi descriu la relació entre la dosi d'irradiació administrada i la fracció de cèl·lules que sobreviuen. Cada tipus cel·lular a unes determinades condicions té una corba de supervivència característica definida per uns paràmetres  $D_0$ ,  $n$  i  $D_q$  característics. La  $D_0$  representa la dosi (Gy) necessària per reduir la supervivència de la població al 37% respecte el valor inicial. La  $n$  i la  $D_q$  s'associen a la capacitat de reparació del dany radioinduït i representen el nombre de dianes que és necessari assolir per produir la mort cel·lular i la dosi a la que l'acúmulo de les lesions subletals comença a ser important, respectivament. Segons aquests paràmetres es pot afirmar que una població cel·lular amb un valor de  $D_0$  petit serà més radiosensible que una població cel·lular amb un  $D_0$  major. Igualment una  $n$  i una  $D_q$  altes indicaran que aquella població té una capacitat per reparar les lesions subletals superior a una població amb una  $n$  o  $D_q$  baixes.



### **6.1. Efectes de les radiacions a l'organisme. Síndromes de la irradiació**

Quan un organisme pateix una dosi adequada d'ICT apareixen un conjunt de símptomes que s'agrupen en els anomenats síndromes d'irradiació total. Primer apareix l'anomenada malaltia de la radiació, que s'inicia durant l'exposició o poc després i es caracteritza per cefalea, vertigen, vòmits, diarrea, etc. Tot seguit, s'inicia la fase de latència, on l'organisme no presenta cap símptoma però s'estan produint canvis degeneratius cel·lulars i respostes proliferatives, per compensar i reparar les lesions. Després comencen a aparèixer els símptomes propis de cada síndrome. Finalment, l'animal mor o es recupera de les lesions. El temps de supervivència i la causa de la mort depèn de la magnitud de la dosi d'irradiació.

En la majoria de mamífers es poden diferenciar tres tipus de síndrome:

- i) A dosis de 2000-10000 cGy la mort es produeix per síndrome neurològica. Els animals moren al cap de poques hores de la irradiació. Se suggereix que pot ser degut a un edema cerebral resultant en una hipertensió endocranial amb resultat de coma i aturada cardíoc-respiratòria.
- ii) A dosi entre 1000-2000 cGy té lloc la mort per síndrome gastrointestinal. La radiació afecta principalment les cèl·lules del revestiment de les vellositats de la mucosa intestinal, que acaben desapareixent. L'animal mor els primers 4-5 dies després de la irradiació.
- iii) A dosi moderades (a partir de 900 Gy i fins a 1000 Gy) els animals moren per síndrome hemopoètica. Aquesta síndrome es caracteritza per una aplàsia parcial o total, depenent de la dosi de radiació rebuda, del teixit hemopoètic, que provoca la mort dels animals en un període comprès entre els 7 fins als 30 dies després de la irradiació.

El sistema hemopoètic és extremadament radiosensible. Com a conseqüència de la irradiació, l'activitat proliferativa de les cèl·lules progenitores es veu sensiblement reduïda, disminueix la producció de cèl·lules madures i això es tradueix després d'uns dies (quan les cèl·lules madures comencen a morir) en un descens en el nombre de cèl·lules funcionals (citopènia) presents a la sang perifèrica (SP). Durant aquest període l'organisme queda exposat a infeccions oportunistes i hemorràgies que poden conduir a la mort.

De manera espontània i sempre que la irradiació no suposi la desaparició completa de totes les CMH (dosi superiors a 15 Gy), la població de cèl·lules progenitores residuals començarà a dividir-se fins a repoblar tots els compartiments que formen el teixit hemopoètic. Ara bé, molt sovint el problema no consisteix en la manca de cèl·lules mare sinó en el fet que la recuperació hematològica és massa lenta per evitar la mort per síndrome hematològica. És a dir, les cèl·lules mare residuals no són capaces de proliferar a una velocitat i/o quantitat suficient per generar un nombre adient de cèl·lules madures funcionals que minimitzi el període de risc per a l'organisme.

D'altra banda, l'eficàcia clínica del tractament amb radioteràpia (i/o quimioteràpia) de moltes malalties, entre elles les neoplàstiques, es correlaciona amb la intensitat de dosi utilitzada. En canvi, la toxicitat que genera sobre el sistema hemopoètic limita la duració i intensitat del tractament.

## **7. Necessitat de condicionament per l'empelt de les cèl·lules trasplantades. Problemàtica oberta.**

Els tractaments preparatoris (condicionament) previs al TCH normalment impliquen donar altes dosis de radioteràpia (acompanyada o no de fàrmacs quimioteràpics), la qual és mielosupressora i altament tòxica. A pesar dels greus efectes secundaris derivats dels tractaments preparatoris, el condicionament es considera essencial per les següents raons:

- i) En cas de malalties malignes, per eliminar o almenys reduir les cèl·lules neoplàstiques del pacient.
- ii) En cas d'un al·loTPL, per immunosuprimir l'hoste i evitar el rebuig de les cèl·lules trasplantades per part del sistema immune de l'hoste.
- iii) Per deplecionar les cèl·lules hemopoètiques del MO del receptor. Alguns estudis indiquen que, per afavorir l'empelt de les cèl·lules infoses, cal aplicar tractaments citoreductius previs al trasplantament per crear espai físic ("ninxols hemopoètics") a la cavitat medul·lar.

Dos possibles tractaments per pacients amb malalties genètiques del sistema hemopoètic tractables amb un TCH són: un al·loTPL histocompatible i un trasplantament autòleg amb cèl·lules hemopoètiques modificades genèticament. Comparat amb el trasplantament al·logènic, la transferència gènica a CMH autòlogues té l'avantatge que probablement no caldrà immunosuprimir perquè no es donarà rebuig de l'empelt ni GVHD i, a més, no existirà la limitació en aconseguir un donant histocompatible.

No obstant, encara no està clar si perquè empeltin les cèl·lules autòlogues transduïdes fa falta tractament citoreductiu i, si és així, quina és la millor estratègia. És una qüestió molt important ja que, per desgràcia, la major mortalitat relacionada amb el període immediat al post-TCH és deguda a la toxicitat del condicionament. Després la mortalitat es produeix sobretot per recaigudes (autòleg) o per GVHD (al·logènica). Tot i això, hi ha varis autors que accepten que els règims preparatoris són necessaris per l'empelt de les cèl·lules trasplantades, inclús en trasplantaments autòlegs, en aquest cas no tant per evitar problemes immunològics com per reduir la competició per part de les cèl·lules hemopoètiques endògenes del receptor. Com s'ha comentat a l'apartat anterior, els primers estudis, als anys 60, per la identificació de les cèl·lules del donant es basaven en l'anàlisi citogenètica del cromosoma Y o de les translocacions cromosòmiques induïdes per irradiació. Takada i col, varen ser els primers investigadors que varen comparar l'empelt de cèl·lules del MO a ratolins irradiats i no irradiats. Contràriament al que es va observar en animals irradiats, en els no irradiats no es detectaren cèl·lules marcades (79, 80). Posteriorment altres investigadors varen obtenir resultats similars (81).

Més endavant, altres grups si han aconseguit empelts de cèl·lules hemopoètiques autòlogues o isogèniques en animals no condicionats (ratolins, gossos i conills). Brecher i col analitzant el cromosoma Y a ratolins femella trasplantats detectaren empelt (16 a un 25%) a ratolins no condicionats de 2 a 13 setmanes post-trasplantament de  $40 \times 10^6$  de cèl·lules per infusió durant 5 dies (infusions) consecutius (82). Obtingueren resultats similars quan es va determinar electroforèticament les variants de PGK utilitzades per la identificació de les cèl·lules del donant i del receptor. Saxe i col, utilitzant un procediment similar, trobaren empelts de l'ordre de 0-16 % al MO i melsa dels ratolins receptors fins 6 mesos després del trasplantament (83). A més, ambdós grups observaren que en alguns casos, el percentatge de quimerisme augmentava amb el número d'infusions i era independent de l'estimulació amb factors de creixement de l'hemopoesi dels donants i/o receptors.

L'aparició, als anys 80, dels mètodes de transferència gènica utilitzant vectors retrovírics i de tècniques de biologia molecular més sensibles per la detecció de marcadors genètics, permet estudiar de manera més eficient aquestes qüestions. En un model caní, Carter i col, varen descriure empelts similars de cèl·lules hemopoètiques transduïdes amb el gen que confereix resistència a la neomicina en gossos que no varen rebre condicionament comparat amb gossos sotmesos a una dosi d'irradiació corporal letal (84). No obstant, en ambdós casos el percentatge de cèl·lules del donant va disminuir fins a l'1% als 10-21 mesos després del trasplantament.

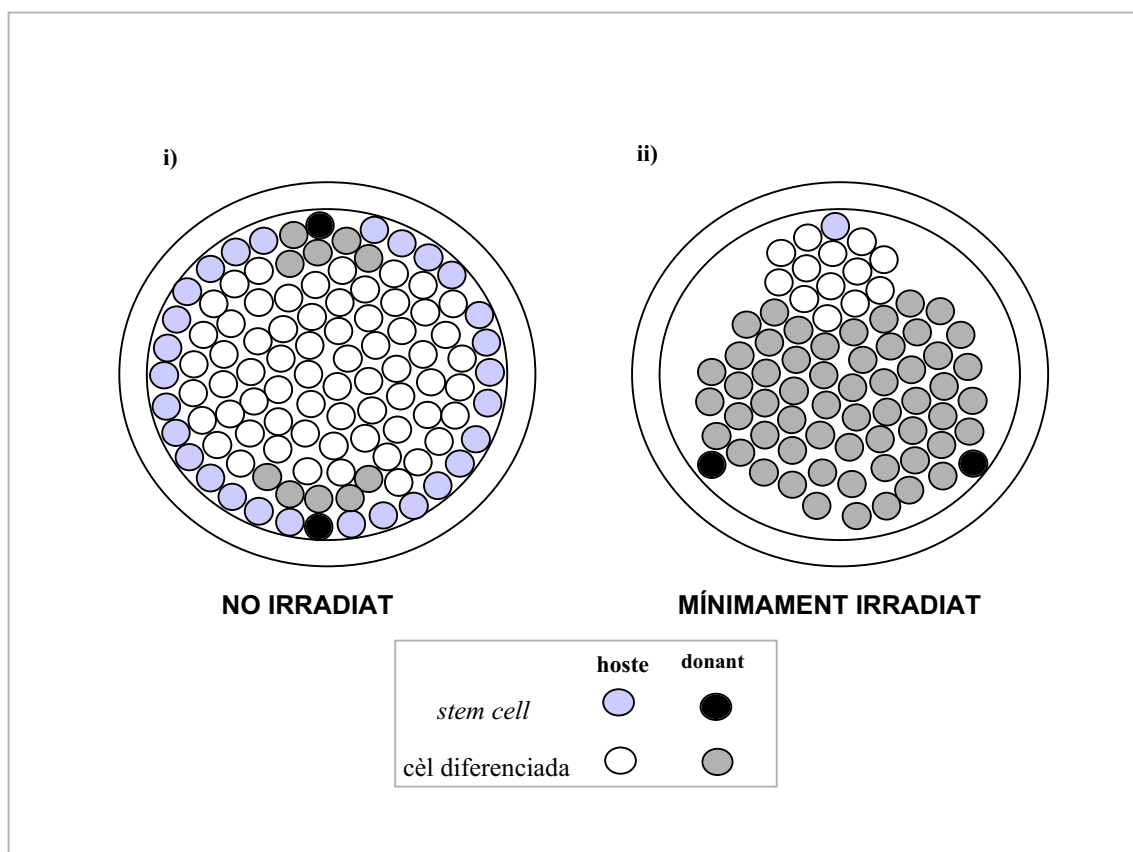
En un estudi on es varen infondre diàriament durant 5 dies consecutius un elevat número de cèl·lules ( $40 \times 10^6/\text{dia}$ ) del MO de ratolins mascles a femelles sense condicionar, Stewart i col observaren que fins un 46% de les cèl·lules del MO eren del donant 10-12 mesos post-trasplantament (85). En un treball similar, on tan sols es va infondre una dosi única de  $20 \times 10^6$  de cèl·lules de donants mascles a femelles normals, 8 setmanes després del trasplantament, aproximadament un 10% de les CMN del MO eren del donant (86). En un treball més recent amb gossos, el grup de Bienzle i col, utilitzant un protocol de transducció diferent a l'anterior (3 setmanes de durada), detecten un percentatge més elevat de cèl·lules del donant (fins un 20%) que perduren durant 2 anys després de la infusió als receptors no condicionats (87). Schiffmann i col també descriuen l'empelt de cèl·lules transduïdes (5%) amb el gen de la glucocerebrosidasa infoses a ratolins no condicionats, 6 mesos després de la infusió (88).

En un altre estudi, vuit gats amb mucopolisacaridosis (MPS) tipus VI d'edats compreses entre 2-12 setmanes varen rebre un trasplantament autòleg amb cèl·lules transduïdes. Tant si els receptors havien rebut condicionament previ al trasplantament com no, s'observà persistència a llarg termini (31 mesos) de les cèl·lules transduïdes. No obstant, els nivells d'activitat enzimàtica eren baixos i no es va poder observar cap benefici clínic (89). Existeix un treball on realitzen transferència gènica amb vectors retrovírics *in vivo* a conills no condicionats, injectant directament les línies productores de retrovirus a la cavitat medul·lar del fèmur del conill (90). Encara que a nivells molt baixos (prop de l'1%) detecten ARNm del vector a la SP dels conills durant 20 mesos després de l'inoculació. En un estudi molt recent en un model murí de MPS tipus VII, trasplanten els receptors (no condicionats) amb macròfags modificats genèticament amb el gen  $\beta$ -glicuronidasa i 38 dies després de la infusió observen presència de cèl·lules transduïdes i es redueix significativament l'emmagatzematge de glicosaminoglicans, traduint-se en un benefici clínic important (91).

Altres estudis demostren que el condicionament, encara que sigui a dosis baixes, afavoreix l'empelt de les cèl·lules trasplantades. De totes maneres, no és incompatible el concepte que hi hagi empelt en receptors no condicionats amb el fet que el condicionament millori l'empelt hemopoètic. En un model caní es va comprovar que amb un tractament condicionador mixt (ciclofosfamida o ICT), inclús a dosis subletals, millorava significativament l'empelt de cèl·lules hemopoètiques autòlogues transduïdes (92). Més endavant, el grup de Quesenberry (93) presenten un treball on infonen  $40 \times 10^6$  de cèl·lules de ratolins mascles a femelles histocompatibles tractades amb dosis mínimes d'irradiació (de 50 a 100 cGy) i obtenen elevats percentatges de quimerisme del donant (40-100%) que es mantenen estables de 2 a 8 mesos després de la infusió. En un treball més actual amb micos, Huhn i col, observen cèl·lules nucleades transduïdes del donant (12%) fins a 33 setmanes

després del trasplantament autòleg realitzat a receptors irradiats amb dosis subletals d'irradiació (500 cGy) (94).

Aquests resultats indiquen que segurament el grau d'empelt o de quimerisme ve determinat majoritàriament per la proporció entre les cèl·lules del donant i les del receptor, és a dir, que hi ha una competició entre elles (Fig.6).



**Fig.6.** Model d'empelt de CMH (*stem cell*) competitiu a (i) receptors normals (no irradiats) i (ii) mínimament irradiats. A dosis mínimament mieloablatives, la creació d'un espai físic mínim ("nínxol") al MO de l'hoste facilita la competició entre les CMH del donant i de l'hoste, ja que disminueix el nombre de cèl·lules endògenes. El grau de quimerisme obtingut vindrà determinat per aquesta competició.

Una altra qüestió important per resoldre és la influència sobre l'empelt de la manipulació *ex vivo* (cultiu amb factors de creixement, 5-FU, transducció retrovítica) de les cèl·lules abans de ser trasplantades en receptors no condicionats o condicionats amb dosis mínimament mieloablatives. Encara no està clar fins a quin punt la manipulació de les cèl·lules trasplantades redueix el potencial repoblador i de nidificació de les CMH al MO, en aquestes condicions. Una de les moltes aplicacions dels factors de creixement és la d'expandir les CMH prèviament al trasplantament o bé, afavorir l'entrada en cicle de les CMH per optimitzar la transferència gènica mediada per retrovirus. El grup de Quesenberry demostren que les manipulacions que indueixen l'entrada en cicle, com ara el pre-tractament dels ratolins donants amb 5-FU, té efectes negatius en l'empelt després d'un TCH en ratolins no condicionats (85, 95).

El mateix grup demostra que l'exposició *in vitro* amb les citocines IL-3, IL-6, IL-11 i SCF també disminueix la capacitat d'empelt de les cèl·lules manipulades tant en receptors no condicionats (96) com en receptors tractats a baixes dosis d'irradiació (45). Més endavant, Kittler i col avaluen l'empelt a llarg termini de cèl·lules cultivades *ex vivo* amb les citocines IL-3, IL-6, IL-11 i SCF i transduïdes amb el gen MDR trasplantades a ratolins no condicionats (97). Catorze mesos post-trasplantament detecten empelt de cèl·lules del donant (9%) però aquestes cèl·lules no contenen el gen MDR. Aquests resultats suggereixen que l'estimulació a la divisió cel·lular per l'entrada del provirus redueix la capacitat LTR de les cèl·lules transduïdes (encara que hi ha altres interpretacions: una baixa eficiència de transducció a cèl·lules amb capacitat LTR, o bé un rebuig immunològic de les cèl·lules transduïdes). No obstant, hi ha estudis en què no es detecta pèrdua en la capacitat d'empelt de les cèl·lules expandides o transduïdes (51, 98).

### 7.1. "Minitrasplantament"

En els trasplantaments al·logènics convencionals habitualment s'apliquen altes dosis de condicionament (quimioteràpia i/o radioteràpia) per intentar destruir el tumor i per prevenir el rebuig de l'empelt. El condicionament amb irradiació no evita la GVHD, per això caldrà donar tractament immunosupressor després del trasplantament. No obstant, com ja s'ha comentat anteriorment, aquests tractaments són molt tòxics i tenen efectes secundaris, especialment en pacients majors de 55 anys, pacients que han presentat toxicitat intensa amb la quimioteràpia convencional o pacients amb història prèvia de trasplantament. En aquests casos, és obligat trobar pautes de condicionament menys tòxiques. Per aquest motiu, en els darrers anys, varis grups d'investigadors han estudiat pautes de condicionament menys mielosupressores, mètode anomenat "minitrasplantament" (99, 100).

El “minitransplantament” es basa en la utilització d’immunosupressors potents (normalment anàlegs de purines pel seu potent efecte antilimfòcits T, entre altres) i dosis baixes de tractament mieloablatiu (normalment ICT) abans del TCH. D’aquesta manera es vol aconseguir l’establiment d’un quimerisme hemopoètic mixt amb hemopoesi del donant i del receptor. L’establiment d’aquesta quimera permet, en una segona fase, administrar infusions de limfòcits del donant (DLI) per afavorir l’efecte de l’empelt *versus* leucèmia (GVL) i eventualment aconseguir una quimera complerta. Aquesta estratègia s’ha aplicat a pacients d’alt risc amb hemopaties malignes susceptibles a l’efecte del GVL (101). Una avantatge important dels “minitransplantaments” és que la incidència i gravetat del GVHD és menor que en els trasplantaments convencionals.

La inducció de quimerismes hemopoètics ha estat molt ben estudiada en el model murí. El grup d’Istad foren els primers en obtenir mètodes per aconseguir la inducció de quimerisme al·logènic hemopoètic en ratolins (102-104). No obstant, altres grups també han presentat resultats interessants en ratolins (105), gossos (106) i primats no humans (107). Fins ara, s’han aconseguit quimerismes hemopoètics mixts estables durant més d’un any en gossos tractats amb una dosi baixa d’ICT (200 cGy), suggerint que s’ha aconseguit un estat de tolerància immunològica.

En el model autòleg, els primers estudis en humans presenten resultats molt encoratjadors (108).

Els “minitransplantaments” son potencialment aplicables al tractament d’hemopaties malignes, malalties hemopoètiques genètiques no malignes (anèmia de cèl·lules falciformes, anèmia aplàstica, i en general totes les susceptibles de ser tractades amb un TCH) i inclús en tumors sòlids. A més, aquesta estratègia de trasplantament també pot tenir molt ressò en la inducció de tolerància en trasplantaments al·logènics no hemopoètics i en teràpia gènica.

### III. Transferència gènica a cèl·lules hemopoètiques

#### 8. Teràpia gènica

És una estratègia terapèutica que consisteix en la utilització de material genètic per tractar o prevenir malalties d'origen hereditari com adquirides. Es presenta com una promesa terapèutica d'utilitat en molts tipus de patologies que pot revolucionar la nostra concepció de la Medicina. L'aparició de la teràpia gènica ha estat possible gràcies a la confluència de l'avançament del coneixement en els camps de Biologia Molecular i Cel·lular, Genètica, Virologia, Bioquímica i Biofísica, entre altres (109).

Gairebé ningú posa en dubte que la teràpia gènica és una de les estratègies més prometedores de les quals disposa la biomedicina actual. No obstant, el desenvolupament de protocols clínics efectius evoluciona molt lentament. Entre els obstacles per superar hi ha: l'estabilitat en l'expressió a llarg termini, la immunogenicitat del producte dels transgen i, en el cas de la teràpia gènica hemopoètica, la necessitat de condicionament.

El primer protocol clínic aprovat de teràpia gènica somàtica començà el setembre de 1990 en 2 nenes amb immunodeficiència greu combinada per deficiència d'ADA (adenosina desaminasa) (110). A partir de llavors, s'han aprovat més de 300 protocols clínics arreu del món. La conclusió principal d'aquests protocols és que la teràpia gènica té potencial per tractar un gran nombre de malalties humanes i que el procediment sembla tenir pocs riscos de reaccions adverses. Desafortunadament, l'eficiència de transferència i expressió gènica en els pacients no és encara suficientment elevada (es discuteix més extensament a l'apartat 10 de l'Introducció).

Existeixen dues categories de teràpia gènica somàtica, les quals es distingeixen per la via d'entrada del gen al teixit afectat (111):

- i) *Ex vivo*, quan les cèl·lules són transduïdes fóra de l'organisme. La teràpia gènica *ex vivo* normalment es porta a terme amb cèl·lules hematopoètiques, limfòcits T o cèl·lules o teixits transplantables.
- ii) *In vivo*, quan el vector és injectat directament a la circulació sistèmica (encara no existeixen exemples clínics d'aquesta categoria).
  - ii.1.) *In situ*, quan el vector és inoculat directament al teixit afectat (ex., la infusió de vectors adenovírics a la tràquea i bronquis de pacients amb fibrosi quística, l'injecció del vector portador del gen de la distrofina directament al múscul d'un pacient amb distròfia muscular, etc).



### 8.1. Mecanismes de transferència gènica

L'elecció de la manera d'introduir un gen per a corregir un defecte està condicionat pel tipus de cèl·lula escollida com a diana (sobretot per la seva capacitat de replicació) i per la naturalesa del defecte, la durada i el nivell de correcció necessària.

Per la introducció de material genètic a una cèl·lula s'han desenvolupat diverses tècniques. Els procediments utilitzats van des dels mètodes físics i químics per la introducció del gen(s) a la cèl·lula (transfecció) als mètodes que utilitzen vectors vírics (transducció). Els sistemes de transfecció més utilitzats es divideixen en:

- i) Mètodes químics: la precipitació en sals de  $\text{Ca}^{2+}$ , els complexos ADN-liposomes, l'endocitosi mediada per receptor: els complexos ADN-proteïna, els liposomes destinats, etc.
- ii) Mètodes físics: l'electroporació, la microinjecció i el "canó de gens" (*gene gun*).

Aquests mètodes són segurs i relativament fàcils d'aplicar. No obstant, hi ha alguns obstacles que impedeixen la utilització d'aquests sistemes per aplicacions *in vivo*: no presenten especificitat, l'eficiència de la transfecció és baixa i, a més, l'expressió del gen generalment és transitòria [àmpliament revisat a (112)].

L'utilització de vectors vírics, per la seva elevada infectivitat i eficiència, és considerat el millor mecanisme per l'introducció de gens a gran escala. Al llarg de l'evolució, els virus s'han especialitzat en infectar les cèl·lules (utilitzant el seu material genètic per fer-se amb el control de la maquinària molecular necessària per la seva pròpia replicació) i per aquesta raó, estan dotats d'excel·lents mecanismes per a introduir-s'hi.

### 8.2. Els vectors basats en virus

Existeixen una varietat important de vectors basats en virus (adenovirus, retrovirus, virus adeno-associats, etc) que són utilitzats com a sistemes de transferència gènica (113), les propietats més importants dels quals es descriuen a la Taula 3.

Els vectors basats en els retrovirus són els més utilitzats en teràpia gènica. Aproximadament un 60 % dels protocols clínics aprovats utilitzen aquests vectors. Actualment, els retrovirus són els únics vectors utilitzats als protocols clínics amb cèl·lules hemopoètiques.

PROPIETATS	RETROVIRUS MURINS (VLM)	VIRUS ADENOASSOCIATS	ADENOVIRUS	VIRUS HERPES	LENTIVIRUS	FOAMY VIRUS
<b>Títol (p.v.i./ml)</b>	10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup> -10 <sup>12</sup>	10 <sup>11</sup> -10 <sup>12</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>10</sup>	10 <sup>6</sup> -10 <sup>8</sup> (*)	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup> (*)
<b>Genoma</b>	ARN	ADNcs	ADNcd	ADNcd	ARN	ARN
<b>Integració</b>	si	no sempre	no	no	si	si
<b>Insert (Kb)</b>	6-7	2-4,5	7-36	10-100	8-9	9-10
<b>Proliferació cel·lular</b>	requereix mitosi	fase S	no requereix	no requereix	no però facilita	no però facilita
<b>Patogenicitat virus helper</b>	potencialment perillós	no	poc patogènic	variable	probab perillós	no patogènic
<b>Resposta hoste</b>	inactivació per complement	?	immunogènica i inflamatòria	? (latent)	?	?

**Taula 3.** Propietats dels vectors vírics (p.v.i., partícules víriques infectives; cs, cadena senzilla; cd, cadena doble; \*, línies productores no estables).

No obstant, encara no existeix el vector ideal per a transduir les CMH. Aquest hauria de complir les següents característiques:

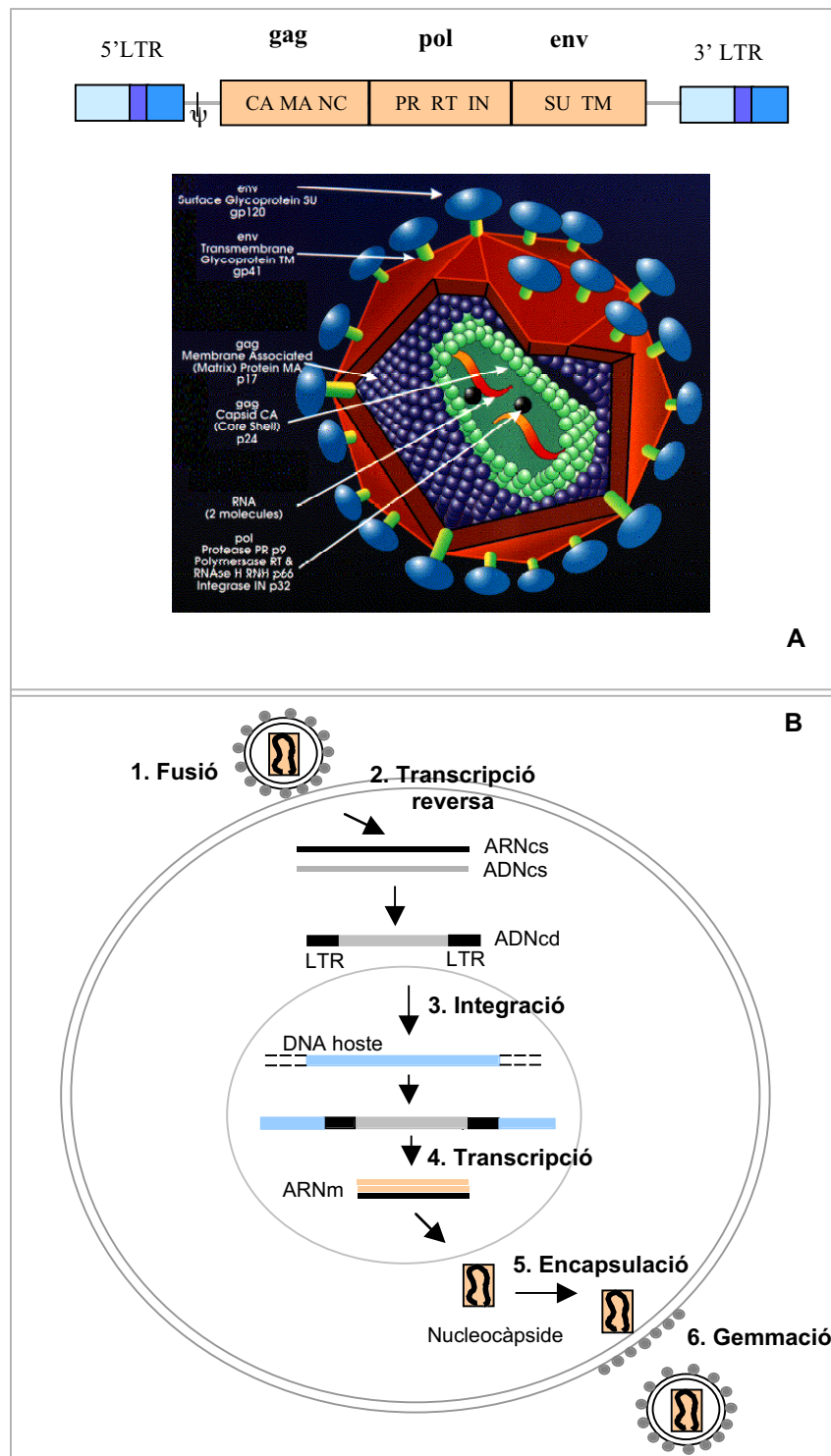
- i) Elevat títol víric (número de partícules víriques infectives × ml<sup>-1</sup>).
- ii) Integrar-se al genoma de la cèl·lula infectada (cèl·lula diana) i expressar-se a llarg termini.
- iii) Capacitat per empaquetar fragments grans de material genètic.
- iv) Transduir cèl·lules quiescents.
- v) No produir virus amb capacitat replicativa (virus salvatges o *helper*).
- vi) No activar la resposta immunològica de l'hoste.

Tal i com s'observa a la Taula 3, cap vector compleix la totalitat de les característiques.

### 8.3. Els retrovirus

La majoria de vectors retrovírics estan basats en el retrovirus de la leucèmia de Moloney murina (VLMoMu). Es tracta d'un virus d'ARN de cadena senzilla (aprox. 9.7 Kb), petit (80-120 nm de diàmetre) que pertany a la família *Retroviridae*, subfamília *Oncovirinae* (114). Està compostat d'un envolta lipídica (derivada de la membrana cel·lular) on s'hi troben inserides les glucoproteïnes codificades pel gen *env* del genoma del retrovirus. Aquestes proteïnes estan formades per dos components: un transmembrana (TM) i l'altre extern, a la superfície (SU), units per ponts disulfur (115). L'interior del retrovirus està compostat pel *core* nucleoproteic i l'ARN (genoma). Les proteïnes estructurals internes, no glicosilades, són codificades pel gen *gag* del genoma del virus. Són les proteïnes de la matriu (MA) de la càpside (CA) i de la nucleocàpside (NC). La tercera regió codificant, *pol*, dóna lloc a la transcriptasa reversa (TR), l'integrasa (IN) i la proteasa (PR). Les regions no codificants del genoma víric inclouen, en primer lloc, la regió *psi* ( $\psi$ ), localitzada a 5' de *gag*, que permet l'empaquetament de l'ARN del retrovirus. En segon lloc, aquests gens es troben entre dos elements repetitius, els *long terminal repeats* (LTR), que actuen d'elements promotors/encebadors i dirigeixen l'integració i replicació del genoma víric així com la transcripció de les proteïnes víriques (Fig.7.A). Tant els LTR com la regió  $\psi$  cal que estiguin en *cis* perquè es produeixi la integració i encapsulació per la formació de les partícules víriques.

La infecció, integració i replicació del retrovirus segueix un cicle de vida específic (Fig.7.B). Després de la unió del virus als receptors cel·lulars, aquests són internalitzats (el retrovirus perd l'embolcall i les proteïnes *env*). La transcriptasa reversa del virus s'encarrega de produir una còpia d'ADN de doble cadena del genoma víric. Aquest ADN arriba al nucli i s'integra al genoma de la cèl·lula (en fase de mitosi). Tots els processos següents depenen de la maquinària molecular de la cèl·lula infectada. El provirus integrat és transmès a tota la progènie derivada de la cèl·lula infectada. La cèl·lula hoste produirà l'ARN i les proteïnes víriques utilitzant l'LTR 5' mentre que la poliadenilació de l'ARN missatger tindrà lloc a les seqüències 3' de LTR. L'encapsulació de l'ARN i les proteïnes, produint-se les partícules víriques, té lloc a l'interior de la cèl·lula. Seguidament els retrovirus sortiran a l'exterior, mitjançant un procés no lític de gemmació, recoberts per membrana lipídica de la cèl·lula infectada.



**Fig.7.** Estructura d'un retrovirus (A). Cicle vital d'un retrovirus (B). (7.A.  $\psi$ , seqüència d'encapsidació; LTR, *long terminal repeat*; CA, càpside; MA, proteïnes de la matriu; NC, nucleocàpside; PR, proteasa, RT, transcriptasa reversa; IN, integrasa; SU, component de superfície; TM, component transmembrana. 7.B. cs, cadena senzilla; cd, cadena doble).

### 8.3.1. Vectors retrovírics recombinants

La producció de vectors retrovírics recombinants és deguda a una estratègia ideada a començament dels vuitanta: les línies empaquetadores. Es tracta de línies cel·lulars immortalitzades on s'ha introduït els tres gens bàsics *gag*, *pol* i *env* (generalment de VLMOmu) del retrovirus, però, sense la regió d'encapsulació  $\psi$  ni els LTR. Aquestes línies podran fabricar ARN i totes les proteïnes del virus però l'encapsulació d'aquest ARN no tindrà lloc ja que els transcrits generats no contenen la regió  $\psi$  [revisat àmpliament per Miller (116)].

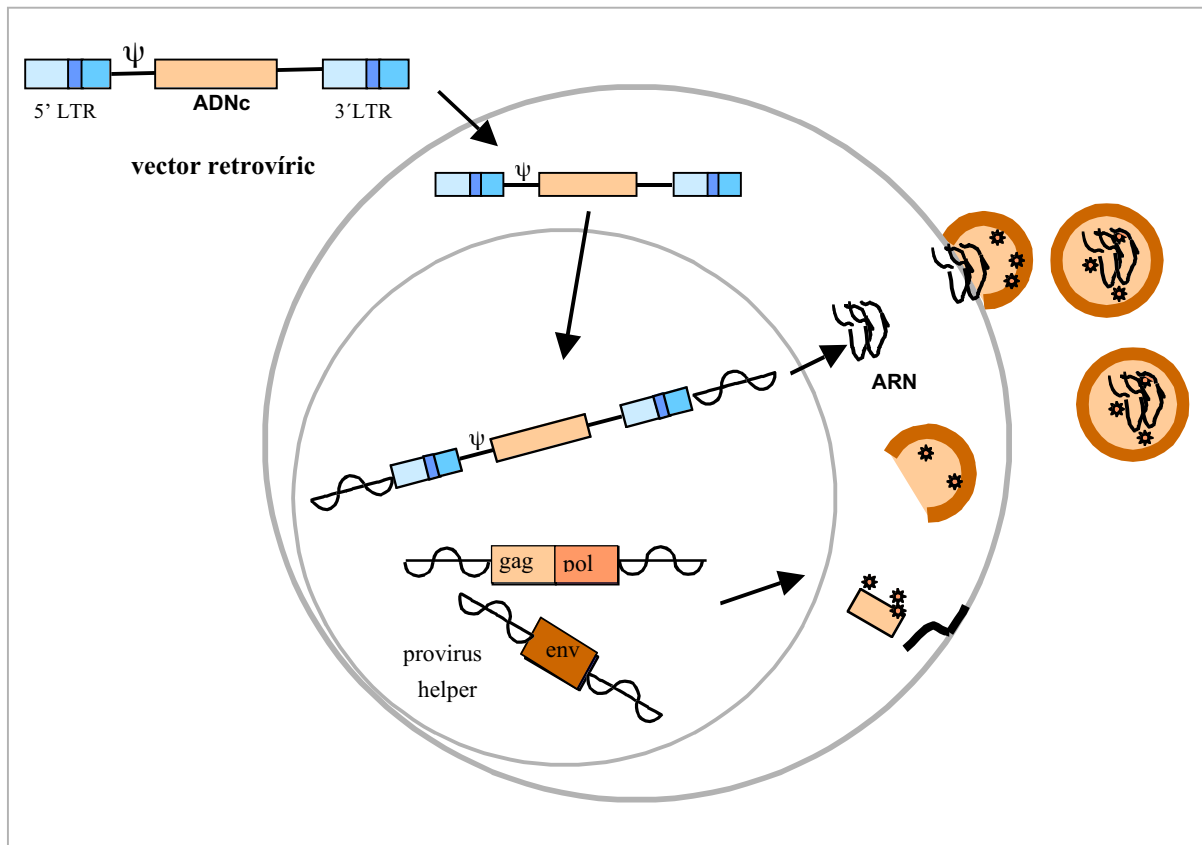
La majoria de línies empaquetadores actuals deriven de les cèl·lules fibroblàstiques murines NIH/3T3 i en menys proporció de les cèl·lules humanes 293 (epiteli de ronyó embrionari). No obstant, contínuament es van desenvolupant línies empaquetadores més efectives (117).

Quan el vector retrovíric, constituït per una o més seqüències d'interès flanquejat pels dos LTR i la seqüència  $\psi$ , s'introdueix a la cèl·lula empaquetadora, aquesta sintetitza l'ARN i les proteïnes estructurals víriques i només és capaç encapsular l'ARN amb el gen d'interès ja que és l'únic transcrit que conté la regió  $\psi$ . Aquestes cèl·lules s'anomenen productores de vectors (Fig.8). En condicions òptimes, els sobrenadants de les línies productores de vectors contenen entre  $10^6$  i  $10^7$  partícules víriques infectives  $\times \text{ml}^{-1}$ .

Els vectors generats poden infectar i integrar-se al genoma de cèl·lules diana, perquè posseeixen totes les propietats necessàries per a fer-ho. No obstant, al no contenir els gens virals bàsics (*gag*, *pol* i *env*), no tenen capacitat replicativa.

Un dels problemes que presenten els vectors retrovírics és la limitació de la mida del gen que poden incorporar (7 Kb), això fa que generalment s'utilitzi ADN<sub>C</sub> enlloc del gen amb la seva estructura completa d'exons i introns. Una altra característica dels retrovirus és que tansols poden infectar cèl·lules que s'estiguin replicant activament (118), fet que suposa un problema important quan es volen infectar cèl·lules quiescents, com ara les CMH. A l'apartat 10 de l'Introducció es comenten àmpliament les estratègies desenvolupades per tal de poder transduir eficientment les CMH utilitzant vectors retrovírics. L'avantatge principal dels vectors retrovírics és l'elevada eficiència d'infecció i integració a cèl·lules en divisió. No obstant, existeixen dos problemes addicionals: la mutagènesi per inserció i la producció potencial de virus recombinants amb capacitat replicativa (virus *helper* o salvatges). L'integració no específica (aleatòria) del retrovirus al genoma de la cèl·lula hoste podria alterar gens cel·lulars (ex., gens supressors de tumors).

L'altre problema potencial dels retrovirus la seva capacitat de recombinació i de produir virus salvatges durant la producció dels vectors recombinats una vegada integrats a la cèl·lula diana. Per minimitzar aquest problema, s'han generat línies empaquetadores que, en primer lloc, separen els gens virals en 2 plasmidis independents i, en segon lloc, presenten diverses delecions i mutacions que redueixen l'homologia entre seqüències del vector i dels elements d'empaquetament. D'aquesta manera, perquè es generin virus *helper* haurien d'esdevenir-se múltiples recombinacions (116).

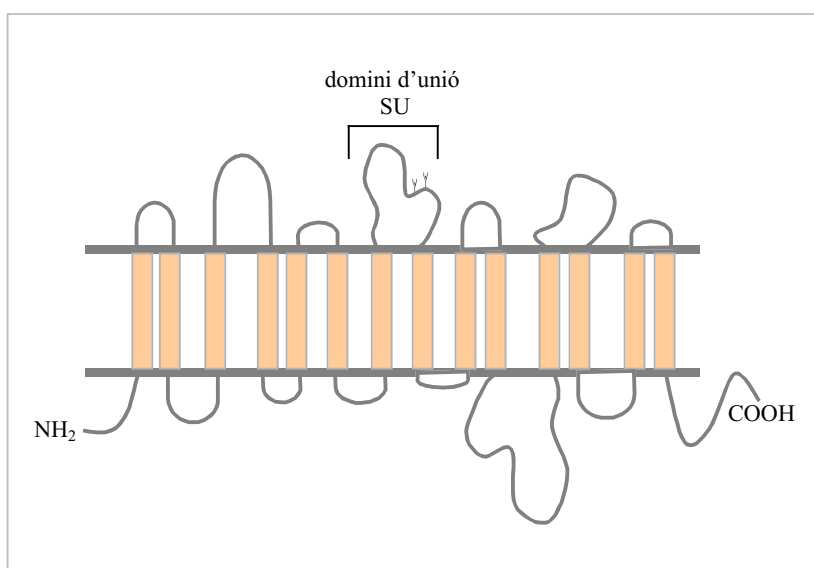


**Fig.8.** Producció de vectors retrovirals per part de les cèl·lules empaquetadores. La cèl·lula empaquetadora conté gens estructurals (*gag*, *env*) i les funcions enzimàtiques (*pol*). La transfecció d'un plasmidi que conté els LTR vírics, el senyal  $\Psi$  i l'ADNc d'interès, produeix l'encapsulació d'un ARN genòmic amb la seqüència d'interès.

### 8.3.2. El receptor ecotròpic de VLMOmu

Els retrovirus de la subfamília *Oncovirinae*, concretament el VLMOmu, estan envoltats per un fragment de membrana lipídica que conté una elevada concentració de la proteïna *env* gp70 (SU), la qual s'uneix a receptors específics de la cèl·lula hoste, determinant així el seu espectre d'infecció. Existeixen dues variants naturals del VLMOmu, l'ecotròpica i l'amfotròpica, que presenten diferent proteïna *env* i reconeixen receptors cel·lulars diferents.

La proteïna gp70 dels retrovirus ecotròpics s'uneix a un transportador cel·lular d'aminoàcids catiónics, CAT-1(115). CAT-1 va ser clonat el 1989 (119). És una proteïna de membrana de 622 aminoàcids (67 KD) que conté almenys 14 dominis transmembrana. Tansols una variació de 2 aminoàcids al lloc d'unió a gp70 de la proteïna CAT-1 murina respecte la mateixa proteïna en humans, restringeix l'unió dels retrovirus ecotròpics a les cèl·lules de ratolí (120) (Fig.9). Funcionalment, es tracta d'un transportador d'aminoàcids catiónics independent de sodi (121).



**Fig.9.** Receptor ecotròpic (CAT-1) del VLMOmu.

Per altra banda, el 1994 es va clonar el gen del receptor dels retrovirus amfotrópics (122). La gp70 dels retrovirus amfotrópics s'uneix a Pit-2, una proteïna transportadora de fosfats present a moltes espècies de mamífers incloent els humans, primats no humans, gossos i ratolins (Taula 4).

Mentre que els vectors retrovírics ecotrópics transdueixen de manera eficient les cèl·lules hemopoètiques de ratolí (51, 123, 124), la transducció de les CMH humanes i de primats no humans amb els vectors amfotrópics és baixa (10, 125-127). Hi ha certa evidència que l'eficiència de transducció de les CMH dependria en part de la densitat de receptors presents a cèl·lules (128). S'ha comprovat que el nivell d'ARNm del receptor ecotrópic present a les cèl·lules hemopoètiques murines és considerablement més elevat que el nivell de missatger de Pit-2 present a les CMH humanes.

### 8.3.3. El pseudotipatge. Noves solucions en l'enginyeria de vectors

Per tal de poder solucionar el problema anterior, s'han desenvolupat els vectors pseudotipats, els quals es basen en la substitució del gen *env* propi pel d'un altre virus. Per exemple, s'ha substituït el gen *env* del vector amfotrópic basat en el VLMoMu i s'ha creat un vector pseudotipat amb l'*env* del virus de la leucèmia del gibó (GALV) (129). Amb aquest vector pseudotipat s'aconsegueix transduir més eficientment CMH humanes que amb els vectors amfotrópics convencionals (130, 131). Aquest fet s'atribueix a una expressió més elevada del receptor funcional de la proteïna *env* de GALV (Pit-1) a les cèl·lules hemopoètiques primitives que del receptor amfotrópic, Pit-2 (Taula 4).

Un altre vector retrovíric pseudotipat utilitza la proteïna G del virus de l'estomatitis vesicular (VSV-G) en combinació amb les gens *gag* i *pol* del VLMoMu (132). Aquest vector té la propietat de poder infectar qualsevol cèl·lula ja que la proteïna G és fusogènica i s'uneix als fosfolípids de la membrana cel·lular. A més, el vector (degut a que la proteïna G és molt estable) té la particularitat de poder-se concentrar per ultracentrifugació fins a títols de fins  $10^9$  partícules víriques infectives  $\times \text{ml}^{-1}$  (133). De totes maneres, aquest sistema no ha millorat els resultats de transducció de CMH humanes obtinguts utilitzant els vectors pseudotipats amb el gen *env* del GALV (134)(veure apartat 10, Introducció).



<b>env</b>	<b>RECEPTOR</b>	<b>FUNCIÓ</b>	<b>ESPÈCIES</b>
<b>ecotrópic</b>	EcoR	Transport aa catiónics	Ratolí
<b>amfotrópic</b> <b>PA317</b>	Pit-2 (Ram-1)	Canal fosfat	Ratolí i Humà
<b>GALV</b> <b>(PG13)</b>	Pit-1 (GLVR-1)	Canal fosfat	Primats
<b>VSV-G</b>	Fosfolípids	Component membrana	Ubiquo

**Taula 4.** Receptors cel·lulars de la proteïna *env* dels retrovirus.

Recentment, varis grups d'investigadors estan creant vectors híbrids que combinen elements de dos o més sistemes vírics per tal d'augmentar l'estabilitat de l'expressió gènica (135). Per exemple, Zheng i col han dissenyat un vector híbrid adenovirus-retrovirus amb el que han obtingut resultats molt prometedors (136).

Una de les últimes aportacions en el camp dels vectors són els lentivirus (137, 138). Aquests vectors, basats en el VIH-1 humà, el FIV, SIV o d'altres, no requereixen que les cèl·lules estiguin en divisió per infectar-les. Per tal de no restringir el seu tropisme a les cèl·lules T o monòcits s'han pseudotipat amb el VSV-G. Hi ha varis treballs on, utilitzant vectors basats en VIH, obtenen elevats nivells de transducció en progenitors hemopoètics humans ( $CD34^+CD38^{low}$ ) amb capacitat de repoblació a llarg termini en ratolins NOD/SCID (139, 140) amb percentatges similars als obtinguts amb vectors retrovírics convencionals (141).

### 8.3.4 El silenciament de l'expressió gènica

L'expressió estable i a llarg termini del transgen és una de les propietats desitjables d'un vector, sobretot en el cas de malalties genètiques en què es persegueix una correcció definitiva. No obstant, un dels problemes que presenten els vectors retrovírics (basats en el VLMOmu) és la tendència a la pèrdua de l'expressió del gen. Això és degut a que els promotors (LTR) del VLMOmu, que són rics en illes CpG, són susceptibles d'ésser metilats i conseqüentment es silencia la transcripció gènica. L'incidència d'aquest fenomen en els vectors derivats de VLMOmu és elevada (142). Per reduir aquest problema es poden utilitzar vectors amb els LTR del *murine embryonic stem cell virus* (MESV) fet que augmenta l'expressió en cèl·lules mare embrionàries murines (143).

Els vectors amb el promotor del *murine stem cell virus* (MSCV) augmenten la durada de l'expressió del transgen en cèl·lules hemopoètiques primitives (144). Baum i col, han creat un promotor híbrid (FMEV), que és l'utilitzat en aquest estudi, que combina la regió U3 de LTR del virus SFFV (*spleen focus forming virus*) amb la regió *leader* de MESV i demostren que augmenta l'expressió del transgen (MDR-1) als progenitors mieloides i a la CMH (145). En aquest mateix sentit, Halene i col, han modificat el promotor del VLMoMu i n'han construït un altre anomenat MND (*myeloproliferative sarcoma virus enhancer, negative control deleted, dl587ref primer-binding site substituted*) que dirigeix l'expressió gènica de forma més eficient que el promotor de VLMoMu (124). A més, els promotors MND i FMEV podrien ser menys susceptibles de ser metilats que els basats en el VLMoMu.

## 9. Marcatge gènic. Eina d'estudi de la biologia de la CMH

Les tècniques de marcatge gènic són molt útils per adreçar qüestions importants en el camp de l'hematologia, la immunologia i la biologia del trasplantament. Pel marcatge gènic s'utilitzen els vectors vírics perquè interessa que les cèl·lules es marquin eficientment i perquè les cèl·lules marcades puguin ser detectades, tant *in vitro* com *in vivo*, ja sigui per la pròpia seqüència o per la proteïna que codifica. Degut que els vectors retrovírics s'integren al genoma de la cèl·lula, són els més utilitzats en els estudis de marcatge gènic. No obstant, tal i com es comenta a l'apartat 8.3.1. de la Introducció, els vectors utilitzats no han de tenir capacitat replicativa ja que el marcador podria ser transferit d'una cèl·lula a l'altra, no només per raons de seguretat sinó per la possible interpretació errònia dels estudis de marcatge.

En hematologia, la major part d'estudis de marcatge gènic han estat utilitzats per a contestar, bàsicament, tres qüestions de la biologia del trasplantament:

- i) Quin és el destí o la cinètica de repoblació *in vivo* de poblacions cel·lulars procedents de diferents fonts (per exemple de MO, SP mobilitzada o SCU) o manipulades *ex vivo* (per exemple, cèl·lules hemopoètiques expandides)?.
- ii) Les cèl·lules tumorals que contaminen el MO o la SP contribueixen a la recaiguda després d'un trasplantament autòleg?.
- iii) Quina és la seguretat i eficiència de les tècniques actuals de transferència gènica *in vivo* abans que aquestes tècniques s'utilitzin en clínica humana per a transferir gens terapèutics?.

A més el marcatge gènic s'ha utilitzat per:

- iv) Estudiar el comportament i la contribució de les cèl·lules mare després del trasplantament (estudis de clonalitat).
- v) Optimitzar els protocols de transducció dels progenitors hemopoètics.
- vi) Possibilitat de selecció de les cèl·lules d'interès (selecció positiva) prèviament al trasplantament.

Els estudis de marcatge gènic de cèl·lules hemopoètiques revelen informació de gran interès sobre el comportament de les CMH. En el passat només es disposava de marcadors clonals com les aberracions cromosòmiques induïdes per radiació. Els vectors retrovírics proporcionen un mètode de marcatge molt més senzill, estable i eficient. La integració dels vectors en els cromosomes de la cèl·lula infectada és aleatòria, de manera que la progènie d'una CMH pot ser identificada fàcilment pel seu punt o punts d'integració. Així doncs, la presència de cèl·lules madures de diferents llinatges hemopoètics portadores del gen marcador en el mateix lloc d'integració demostra que la cèl·lula marcada inicialment tenia capacitat multillinatge. En canvi, la presència d'un mateix marcador només en determinats llinatges identifica a una cèl·lula progenitora més madura. En els últims anys s'han desenvolupat tècniques, basades en la PCR o el *Southern*, per estudiar aquesta clonalitat (146). Concretament, en el model murí, s'han diferenciat 2 fases durant la regeneració de l'hemopoesi post-trasplantament: un primer interval de 4-6 mesos amb una marcada fluctuació de clons i un altre, molt més llarg, amb una activitat estable només d'uns quants clons (model de successió clonal) (147). Recentment, hi ha evidències que aquest model també seria vàlid per cèl·lules humanes (SCR) (12).

### **9.1. Gens marcadors**

En un estudi de marcatge el gen marcador no hauria de tenir cap impacte, ni positiu ni negatiu, a la cèl·lula diana, en termes de supervivència, proliferació o diferenciació. Els marcadors utilitzats en els primers estudis de marcatge foren els gens bacterians que confereixen resistència a antibiòtics, com ara el gen de la neomicina fosfotransferasa (*neo*) o els que proporcionen resistència a la higromicina i la puromicina. No obstant, aquests gens codifiquen per proteïnes foranes per l'organisme i existeix la possibilitat que es desencadeni una resposta immunològica contra aquesta proteïna (s'entén que un marcador ideal no hauria de codificar per proteïnes immunogèniques).

També s'ha utilitzat sovint el gen de multiresistència a fàrmacs (MDR-1). Entre altres estudis, s'ha descrit que l'administració de taxol a dosis baixes a ratolins trasplantats amb cèl·lules transduïdes amb el gen MDR-1 permet una selecció *in vivo* (148). També s'han utilitzat els enzims  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa i fosfatasa alcalina per la identificació de cèl·lules transduïdes amb retrovirus. No obstant, en el cas per exemple de la  $\beta$ -galactosidasa, l'activitat endògena de l'enzim o d'altres enzims que degradin el mateix substrat presents a altres cèl·lules, podria falsejar els resultats.

La baixa eficiència de transducció de les CMH podria ser compensada per una selecció de les cèl·lules transduïdes. La selecció de les cèl·lules primàries marcades amb gens que confereixen resistència a fàrmacs requereix el cultiu de les cèl·lules *ex vivo* durant dies o setmanes (en aquest temps de cultiu les cèl·lules es diferenciaran). Utilitzant gens marcadors que codifiquen per proteïnes detectables per citometria de flux o tècniques immunohistoquímiques, es pot dur a terme una selecció més ràpida de les cèl·lules transduïdes, evitant els problemes anteriorment comentats. Per exemple, la forma truncada del receptor de baixa afinitat del factor de creixement nerviós humà (LNGFR) ha estat utilitzat com a gen marcador de cèl·lules hemopoètiques (149). L'avantatge d'utilitzar aquest gen és que s'eviten les possibles complicacions derivades de la immunogenicitat del producte del transgen ja que es tracta d'una proteïna de superfície present en les cèl·lules humanes. No obstant, un problema que pot presentar aquest sistema de marcatge és el segrest del factor de creixement nerviós per part de les cèl·lules marcades. Un altre exemple de gen marcador que pot ser detectat per citometria de flux és la proteïna de superfície humana CD24 i el seu anàleg murí, l'antigen estable a la calor (HSA) (150, 151).

Malaltia	Cèl·lula diana	Gen(s)	Resultats
Melanoma	LIT	neo	Detecció transitòria de les cèls marcades
Neuroblastoma	Cèls residuals tumorals MO	neo	Cèls tumorals marcades a la recaiguda
	CMH de MO		Persistència de CFC normals marcades
SIDA	Limfòcits T	tk	Detecció transitòria de cèls T marcades, evidència de
		higro	rebuig de les cèls marcades
Leucèmia Aguda	Cèls residuals tumorals MO	neo	Fracàs del marcatge, tant a cèls tumorals
	CMH de MO		com hemopoètiques
Receptors de TMO	Limfòcits T estimulats	neo	Detecció cèls marcades, desaparició de cèls
al·logènics	amb VEB	tk	marcades després tractament amb ganciclovir
		NGFR	Rebuig immunològic de neo i tk

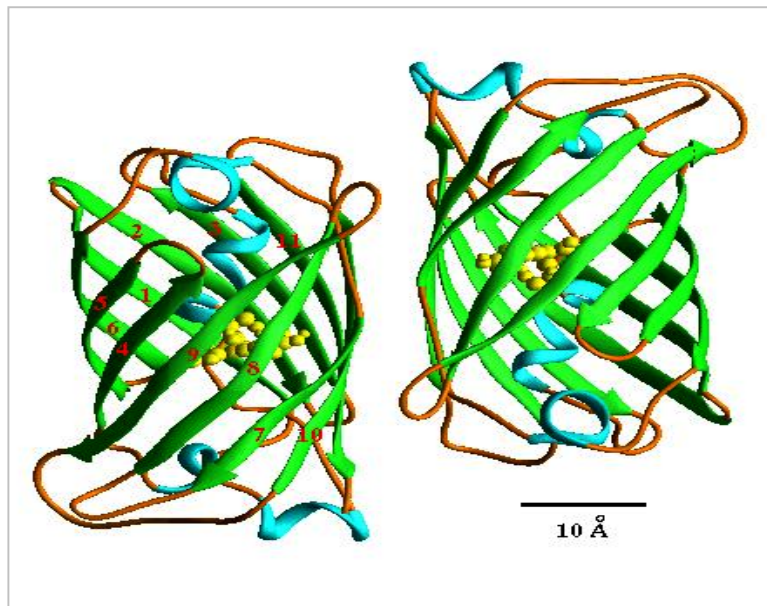
**Taula 5.** Alguns estudis clínics publicats (152) de marcatge gènic.

LIT, limfòcits infiltrants de tumor; neo, gen de resistència a la neomicina; higro, gen de resistència a l'higromicina; VEB, virus d'Epstein-Barr; tk, timidina quinasa; NGFR, receptor truncat del factor de creixement nerviós

Recentment, la proteïna fluorescent verda de la medusa *Aequorea victoria* també està essent utilitzada com a gen marcador i és, en molts punts, superior als altres marcadors.

### 9.1.1. (E)GFP

L'ADNc de la GFP va ser clonat i seqüenciat el 1992 (153). Codifica per una proteïna de 238 aminoàcids i un pes molecular de 27 kD. Té la capacitat d'absorbir la llum UV (pic d'absorció màxima, 395 nm) i emetre llum verda (pic d'emissió màxima, 509 nm). El cromòfor consisteix en un anell d'imidazolona format per l'autociclació dels aminoàcids 65-serina, 66-tirosina i 67-glicina. La GFP s'ha expressat artificialment en moltes espècies, com ara, bacteris, plantes, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, el peix zebra i en mamífers (154).



**Fig.10.** Estructura tridimensional de la GFP.

L'EGFP és una variant de la GFP amb l'espectre d'emissió desplaçat cap al vermell que conté dues mutacions (S65T i P64L) a la regió del cromòfor de la proteïna. EGFP presenta una intensitat de fluorescència més elevada que la forma salvatge i una elevada expressió en mamífers (155). A més, el gen conté un ORF (*open reading frame*) que està format bàsicament per codons d'ús preferent humà (156). L'ús combinat de tots aquests canvis augmenta el nivell de fluorescència 35 vegades respecte a la GFP natural, quan la proteïna és excitada a 488 nm.

L'activitat fluorescent de l'EGFP no requereix substrats ni cofactors per tant les cèl·lules que expressen el marcador poden ser visualitzades directament per microscòpia fluorescent o/i FACS (els espectres d'absorció i emissió són similars als de l'isotiocianat de fluoresceïna, per tant, els filtres dissenyats per aquest fluorocrom són adequats per l'EGFP).

A part de la gran utilitat de l'EGFP en els estudis de marcatge gènic, les característiques fluorescents d'aquesta proteïna fan d'aquesta un sistema realment atractiu en altres camps de la teràpia gènica. Aquest marcador, permet una anàlisi de les cèl·lules transduïdes, per microscòpia de fluorescència o citometria de flux, a temps real i una separació cel·lular directa per FACS. No és així en el cas d'altres marcadors, com ara, els gens que confereixen resistència a fàrmacs, ja que per la quantificació de la transducció fan falta mètodes de selecció llargs i tediosos.

Des que va aparèixer l'EGFP, varis grups han construït amb èxit línies productores de retrovirus que contenen el gen per estudis de marcatge gènic de cèl·lules hemopoètiques tant *in vivo* com *in vitro* (123, 157). El nostre grup vàrem obtenir una línia productora de retrovirus amfotrópics estable amb el gen EGFP (158, 159). Amb el sobrenadant d'aquesta línia s'ha transduït una gran varietat de línies cel·lulars i cèl·lules hematopoètiques primàries humanes. Més endavant, vàrem desenvolupar una nova línia estable productora de retrovirus pseudotipats amb el gen *env* del GALV amb la qual vàrem ser capaços de transduir de manera més eficient les cèl·lules hemopoètiques humanes més primitives amb capacitat de repoblació en ratolins NOD/SCID (11, 131).

## 10. Transferència gènica a CMH

Existeixen malalties genètiques de les cèl·lules hemopoètiques que poden ser corregides amb un TMO al·logènic. Exemples d'aquests desordres que han estat tractats satisfactòriament amb un al·lotrasplantament són les hemoglobinopaties, les immunodeficiències, malalties d'emmagatzematge lisosomal i defectes de les CMH, com ara l'anèmia de Fanconi.

Els efectes indesitjables derivats d'un TMO al·logènic, com ara el rebuig de l'empelt, el GVHD i els requeriments d'immunosupressió post-trasplantament, fan considerar la teràpia gènica, utilitzant les cèl·lules hemopoètiques autòlogues, com un tractament més idoni. A més, el fet de poder modificar genèticament les CMH podria conferir unes propietats noves a aquestes cèl·lules i a la seva progènie, com ara, resistència als efectes de la quimioteràpia.

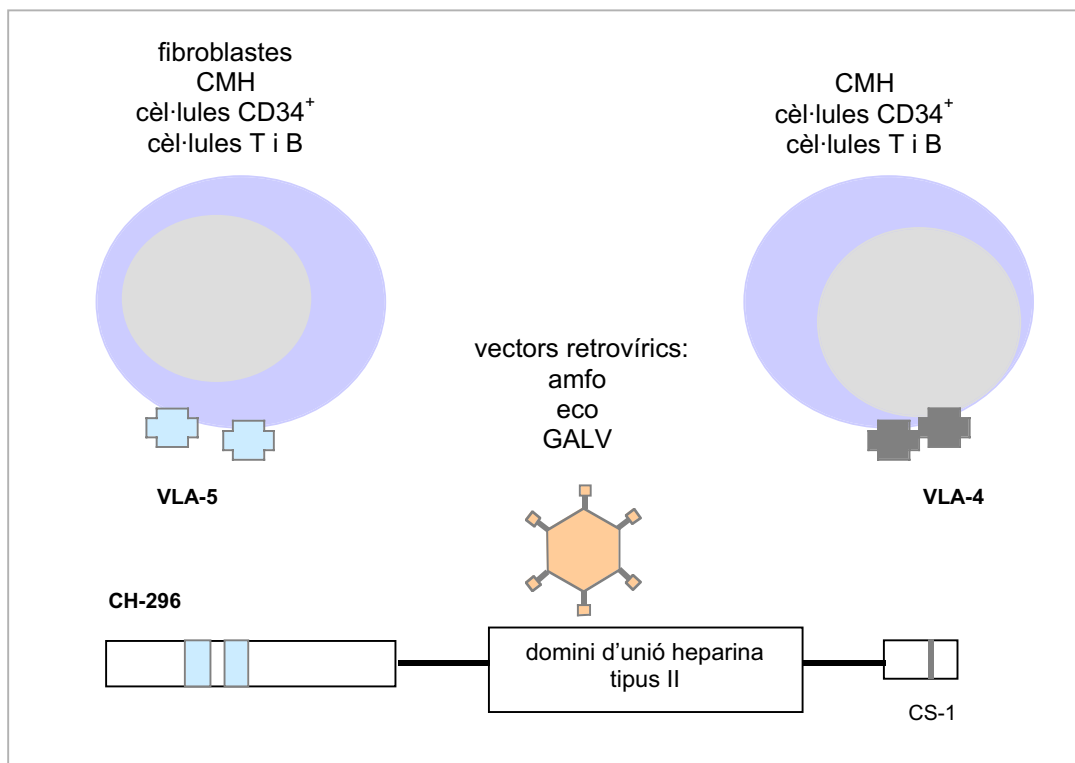
Idealment, la teràpia gènica dirigida a CMH hauria de complir els següents requisits:

- i) L'eficiència de transducció ha de ser suficientment elevada per tal proporcionar un benefici terapèutic.
- ii) Empelt i supervivència de les cèl·lules transduïdes *in vivo* amb la mínima mieloablació.
- iii) Expressió a llarg termini del transgen.
- iv) Tolerància immunològica al producte del transgen.
- v) El risc pel pacient ha de ser mínim.
- vi) Cost-benefici favorable.

### 10.1. Transferència gènica a CMH no humanes

El model murí és el més utilitzat en els experiments de transferència gènica. El 1983, Joyner i col van descriure la primera transducció *in vitro* de cèl·lules hematopoètiques murines utilitzant un vector retrovíric (basat en el VLMoMu) que contenia el gen de la neomicina fosfotransferasa (160). Tot i que als inicis l'eficiència de transducció aconseguida en les CMH murines no era massa elevada (al voltant del 10%), actualment han millorat moltíssim els protocols de transducció. Varis grups han presentat bons resultats de transferència gènica a cèl·lules hemopoètiques murines. S'han presentat resultats *in vivo* que van d'un 20 fins un 80% de cèl·lules hemopoètiques dels diferents llinatges que contenen el transgen durant la vida del ratolí (59, 161-163).

Amb l'intenció de reduir el nombre de cèl·lules diana diferenciades (irrellevants) per a la transducció de progenitors hemopoètics, destaca la tècnica del pre-tractament *in vivo* dels ratolins donants amb l'agent quimioterapèutic 5-FU. Aquest fàrmac bloqueja la síntesi d'ADN i elimina les cèl·lules en cycle cel·lular. Això indueix la divisió de les CMH i per tant augmenta la seva eficiència de transducció. No obstant, la transferència gènica a CMH murines només ha estat possible gràcies a la incorporació als protocols de transducció de factors de creixement hemopoètics, com ara l'IL-3, l'IL-6 i l'SCF. L'inclusió d'aquestes o altres citocines durant el cultiu *ex vivo* de les cèl·lules facilita la supervivència (123), l'entrada en cycle i/o el manteniment de la viabilitat de les cèl·lules amb capacitat de repoblació *in vivo* (148, 164). Han aparegut altres factors que milloren l'eficiència de transducció en el model murí. Per exemple, el cobriment de la superfície de cultiu amb el fragment recombinant de la fibronectina CH-296 permet la co-localització de les partícules víriques i les cèl·lules diana (165). Les cèl·lules s'uneixen al fragment CH-296 a través de les proteïnes cel·lulars VLA-4 i VLA-5, o també a través del reconeixement de la seqüència CS-1 del fragment CH-296 que conté el lloc central d'unió a les cèl·lules. Els retrovirus s'uneixen al domini d'unió a heparina II de CH-296 (Fig.11).



**Fig.11.** Co-localització dels retrovirus i les cèl·lules diana al fragment CH-296.



Sembla que l'estimulació *ex vivo* de les cèl·lules del MO murines amb les citocines IL-3 i IL-11 reduiria la capacitat repobladora de les cèl·lules transduïdes. Aquesta aportació no és sorprenent si es té en compte que altres autors han demostrat com el cultiu *ex vivo* de CMH en presència de factors de creixement redueix la capacitat repobladora en comparació amb les cèl·lules fresques (no manipulades), tant en receptors normals (no condicionats) com condicionats (45, 97). Els vectors retrovírics requereixen que les cèl·lules estiguin en divisió per integrar-se, no obstant, les divisions cel·lulars juntament amb les combinacions subòptimes de factors de creixement presents al cultiu, poden induir la diferenciació cel·lular i la pèrdua de la capacitat repobladora a llarg termini. Una les últimes aportacions en la transferència gènica a cèl·lules hemopoètiques murines és l'estudi de Wognum i col en el qual es demostra que les cèl·lules de MO murines transduïdes estimulades amb trombopoetina (TPO), *kit ligand* (KL) i Flt3-L tenen una capacitat de repoblació tant a curt com a llarg termini unes 30 vegades superior a les mateixes cèl·lules incubades amb les combinacions KL/Flt3-L/TPO/IL-3 o KL/Flt3-L/TPO/IL-3/IL-11 (51). D'aquest estudi s'evidencia una vegada més la importància d'un cultiu òptim *ex vivo* per a la transferència gènica a les CMH conservant el seu potencial de repoblació hemopoètica *in vivo*.

A diferència del que passa en el model murí, les cèl·lules hemopoètiques totipotents d'altres mamífers no humans (conills, gossos, gats, ovelles i primats) són més difícils de transduir mitjançant retrovirus (10, 89, 90, 92, 125, 126, 166).

Els models de transferència a primats no humans són probablement els més propers a la clínica humana. No obstant, treballar amb primats és poc assequible des del punt de vista econòmic i també per requeriments d'infraestructura. Els primats com el macaco o el babuí requereixen un nombre similar de progenitors hemopoètics que els humans en un TMO al·logènic. Així doncs, gairebé es poden aplicar els mateixos protocols de selecció, transducció i trasplantament que els utilitzats en clínica humana. En els primers estudis amb primats, àmpliament revisats per van Beusechem i Valerio (166), després d'una infusió de cèl·lules transduïdes *ex vivo* en micos condicionats no s'aconseguia superar l'1% de cèl·lules marcades a la sang dels micos trasplantats. No obstant, més recentment, utilitzant els avenços en el disseny de vectors i els nous protocols de transducció descrits més endavant, els investigadors han obtingut fins un 10% de transducció en tots els llinatges hemopoètics després de la transducció retrovírica de les CMH dels primats (127, 167-169).

## 10.2. Transferència gènica a CMH humanes

A meitats dels 90 l'eficiència de transducció de les CMH humanes era un problema. Gràcies als estudis previs realitzats en ratolins i a la incorporació d'altres millores tècniques, actualment és possible transduir eficientment CMH humanes. Un fet que ha facilitat la transferència gènica a les CMH humanes és la utilització de marcadors de superfície per identificar-les. Un dels més rellevants és l'antigen CD34<sup>+</sup>. Aproximadament un 1-2% de les cèl·lules del MO humà expressen aquest marcador. La fracció CD34<sup>+</sup> està enriquida en cèl·lules amb capacitat repobladora i per aquesta raó actualment són àmpliament utilitzades en el TMO, tant autòlegs com al·logènics. A més, l'enriquiment de les cèl·lules repobladores primitives gràcies a la immunoselecció per l'antigen CD34<sup>+</sup> ha permès, entre altres coses, augmentar l'eficiència de transducció d'aquestes cèl·lules ja que al reduir-se dramàticament el número de cèl·lules diana disminueix també la quantitat de vector que es necessita (millora la MOI).

En la majoria de protocols clínics de teràpia gènica hemopoètica s'utilitzen cèl·lules CD34<sup>+</sup>. No obstant, alguns estudis suggereixen que algunes cèl·lules CD34<sup>-</sup> posseeixen propietats de CMH, fet que fa reconsiderar el valor de CD34 com un marcador de cèl·lula primitiva (170). A més, Ogawa i col, han demostrat l'expressió reversible de CD34 en les CMH murines, suggerint que l'antigen funcionaria com un marcador d'activació (171).

Els vectors retrovírics són els que s'utilitzen més per la transferència gènica a CMH. Com s'ha comentat anteriorment, aquests vectors només s'integren als cromosomes de les cèl·lules que estan en divisió. La major part de les CMH són quiescents, per tant, no poden ser transduïdes mitjançant retrovirus. Les primeres citocines utilitzades en els protocols de transferència gènica retroviral a cèl·lules CD34<sup>+</sup> humanes foren l'IL-3, l'IL-6 i l'SCF. Més endavant s'han inclòs nous factors de creixement, especialment Flt3-L i la TPO, que indueixen l'entrada en cicle de les cèl·lules mare, preservant-ne les propietats de pluripotencialitat, autorenovació i capacitat repobladora de manera més eficient que les anteriors combinacions de citocines (11, 131, 172, 173). L'última aportació en aquest terreny seria l'incorporació de l'IL-6 juntament amb la forma soluble del receptor de l'IL-6 (sIL-6R) al cultiu de cèl·lules hemopoètiques humanes (174) o bé la proteïna de fusió d'ambdues molècules (IL6/RIL6, anomenat hiper IL-6) (175). Ambdues també afavoreixen l'estimulació de la proliferació dels progenitors hemopoètics humans mantenint la seva capacitat repobladora *in vivo*.

La incorporació del fragment CH-296 als protocols de transducció de cèl·lules hemopoètiques humanes també ha afavorit la transducció retrovívica i el manteniment del seu potencial repoblador (176, 177). No obstant, en un treball recent, Hennemann i col, transdueixen eficientment cèl·lules mare amb capacitat LTR en ratolins NOD/SCID utilitzant un protocol de transducció sense fibronectina recombinant, únicament estimulant amb citocines (IL-3, SCF, Flt3-L, hiperIL-6) (178).

La generació de línies empaquetadores de retrovirus pseudotipades amb el gen *env* del GALV o amb la proteïna G del VSV també ha contribuït en la millora de l'eficiència de transducció dels progenitors hemopoètics humans (131, 134) i de primats no humans (127).

Per altra banda, la creació per enginyeria genètica de nous vectors retrovírics, com ara el FMEV (145) conjuntament amb l'aparició dels nous marcadors gènics, com ara l'EGFP, han facilitat tant l'integració com el seguiment de l'expressió del transgen a les cèl·lules hemopoètiques primitives (11, 131, 158, 159) (124). Seguint en aquesta línia, també s'han desenvolupat nous models de trasplantament xenogènic, basats en ratolins immunodeficients com ara els NOD/SCID (179, 180) i els ratolins bnx (181) per estudiar *in vivo* la capacitat repobladora dels progenitors hemopoètics humans.

Finalment, és important recordar (apartat 8.3.3, Introducció) que el més recent en vectors retrovírics són els basats en el lentivirus VIH-1. L'avantatge d'utilitzar els lentivirus és que poden infectar tant les cèl·lules en divisió, en aquesta característica no es diferenciarien dels altres vectors retrovírics, com les quiescents (CMH, hepatòcits, neurones). Estudis preliminars demostren que els vectors basats en VIH-1 són capaços d'infectar eficientment CMH amb capacitat repobladora a llarg termini (139-141).

## 11. Protocols clínics de teràpia gènica amb CMH

Els requeriments bàsics per assegurar l'èxit de la teràpia gènica a les CMH són: la transferència gènica eficient als progenitors hemopoètics, l'expressió estable i a llarg termini del transgen a les cèl·lules hemopoètiques i l'empelt (a llarg termini) de les cèl·lules transduïdes.

Els primers estudis de transferència gènica a cèl·lules hemopoètiques foren en pacients sotmesos a un TCH autòleg. El MO d'aquests pacients es va marcar amb vectors retrovírics per investigar la contribució de les cèl·lules trasplantades a la recaiguda, en el cas de leucèmies. Alguns dels protocols clínics de teràpia actius que utilitzen CMH com a dianes de transducció, són:

### I. Protocols clínics actius de teràpia gènica utilitzant CMH

1. Síndrome de l'Immunodeficiència Combinada Severa (SCID) per deficiència d'ADA
2. SCID per deficiència de la subunitat  $\gamma$  del receptor d'IL-2/4/7/9/15 (SCID-X1)
3. Malaltia Granulomatosa Crònica
4. Malaltia de Gaucher
5. Anèmia de Fanconi
6. Mucopolisacariidosi
7. MDR-1 i altres gens de resistència a fàrmacs per pacients oncològics
8. HIV-1 amb ribozims

En la majoria de protocols clínics amb humans, el percentatge de cèl·lules transduïdes a la SP dels pacients és molt baix i aquestes cèl·lules tenen una vida molt curta, suggerint que no s'ha pogut transduir les CMH eficientment. Però, el potencial per aplicar les tècniques de transferència gènica a CMH pel tractament de malalties genètiques, infeccioses o malignes va en augment. La taula següent és un llistat d'algunes de les malalties candidates a teràpia gènica utilitzant CMH.

## II. Algunes malalties candidates a teràpia gènica utilitzant CMH

---

1. Immunodeficiències primàries
  - SCID
  - Malaltia Granulomatosa Crònica
  - Agammaglobulinèmia lligada al cromosoma X
2. Hemoglobinopaties
  - Talassèmia
  - Anèmia falciforme
3. Malalties d'emmagatzematge lisosomal
  - Malaltia de Gaucher
  - Síndrome de Hurler
  - Síndrome de Hunter
  - Adrenoleucodistrofia
4. Malalties de les CMH
  - Anèmia de Fanconi
5. Càncer
6. Malalties infeccioses
  - SIDA

Les malalties específiques que han estat considerades per a protocols de teràpia gènica generalment han estat triades en primer lloc, perquè són conegudes a nivell molecular i perquè amb nivells baixos de transferència gènica i sense necessitat d'una regulació de l'expressió es poden obtenir beneficis clínics. A nivell especulatiu aquests serien els percentatges de transducció a CMH esperats per aconseguir beneficis clínics en les malalties següents:

### III. Percentatge de transferència gènica esperat a CMH per tal d'aconseguir beneficis clínics en malalties específiques

---

**Baix nivell de transferència gènica (0.01%) seria beneficiós per**

- Deficiències immunes congènites
- Anèmia de Fanconi
- SIDA

**Nivells moderats de transferència gènica (0.05-5 %) es necessitarien per**

- Malalties d'emmagatzematge lisosomal
- Deficiències proteiques: hemofília, deficiència  $\alpha_1$ -antitripsina
- Resistència a quimioteràpia

**Alt nivell de transferència gènica (100%) es requeriria per**

- Hemoglobinopaties
- Càncer: antisense, antioncogens, gens supressors de tumors

Tot i això, hi ha hagut alguns resultats força prometedors. Els pacients del primer protocol amb CMH de Brenner i col, un estudi de marcatge gènic en nens amb leucèmia aguda, continuen presentant cèl·lules hemopoètiques marcades després de vuit anys de l'única infusió de cèl·lules de MO transduïdes amb vectors retrovírics (182).

Per altra banda, els nens i els infants amb SCID per deficiència d'ADA, després de 6 anys del tractament encara presenten limfòcits marcats a SP, encara que continuen rebent tractament substitutiu amb l'enzim conjugat amb polietilenglicol (PEG-ADA).

Més impressionant és el protocol de transferència gènica a cèl·lules de MO de nens amb SCID-X1, una immunodeficiència hereditària lligada al cromosoma X que es caracteritza pel bloqueig de la diferenciació dels limfòcits T i les cèl·lules NK. Aquest bloqueig és degut a mutacions al gen que codifica per la subunitat  $\gamma$ c del receptor de les interleucines IL-2, -4, -7, -9 i -15, les quals participen en la diferenciació i supervivència dels progenitors limfoides. Cavazzana-Calvo i col, utilitzant les mateixes tècniques que resultaren en una millora de la transducció en primats superiors (167) (SCF, Fl3t-L i fibronectina recombinant) s'ha produït una reconstitució a curt termini del sistema immune amb limfòcits T transduïts (183). Si aquest resultat es manté, representarà una gran aportació en el camp de la teràpia gènica. Esdevindrà el primer protocol d'una malaltia genètica tractada mitjançant CMH transduïdes on s'haurà obtingut un benefici clínic.