

CAPÍTULO 6

SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL COMO FUENTE DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS PARA TRASPLANTE

DRA. M^a DOLORES MIÑANA*

DR. FRANCISCO CARBONELL**

DRA. EMILIA MATEU***

DRA. ARACELI ENCABO*

** Instituto de Biología Celular. Organismo Público
Valenciano de Investigación. Valencia*

*** Centro de Transfusión de la Comunidad
Valenciana. Valencia*

**** Instituto Valenciano de Infertilidad. Valencia*

El trasplante de células madre hematopoyéticas (CMHs) se ha venido usando en estas tres últimas décadas para reconstituir la hematopoyesis tras tratamientos mielo-ablativos. El trasplante de CMHs se utiliza para tratar una extensa variedad de enfermedades hematológicas y no hematológicas, habiéndose establecido como terapia para muchas patologías congénitas o adquiridas del sistema hematopoyético y para las enfermedades quimio o radio-sensibles. La fuente de CMHs se ha ido ampliando en estos últimos años, obteniéndose de médula ósea (MO), sangre periférica movilizada, y más recientemente de sangre de cordón umbilical (SCU). El primer trasplante de SCU se llevó a cabo en el año 1988 y en la actualidad se han realizado más de 2.000 trasplantes, habiéndose convertido la SCU en una fuente de progenitores hematopoyéticos (PHs), alternativa a la tradicional de médula ósea.

En estos últimos años, ha habido un gran interés en expandir y manipular las células madre hematopoyéticas (CMHs) para aumentar su potencial terapéutico. En este artículo se hará una breve descripción de las características de las células madre hematopoyéticas y se comentará los últimos avances obtenidos en protocolos de expansión.

Estado actual del trasplante de SCU

La presencia de PHs en la SCU se demostró por primera vez en 1974¹, diez años más tarde se demostró la presencia de PHs primitivos². Sin embargo no fue hasta el año 1988 cuando se realizó el primer trasplante de SCU entre hermanos HLA-idénticos, para tratar a uno de ellos con anemia de Fanconi³. Este paciente en la actualidad se encuentra bien, con reconstitución completa del sistema linfo-hematopoyético.

Desde entonces, el conocimiento de las características biológicas de la SCU ha aumentado y las ventajas de su utilización para trasplante son cada vez mayores.

Las principales ventajas de utilizar la SCU como una fuente alternativa de CMHs son, la facilidad de su obtención, ausencia de riesgo para el donante, un riesgo reducido de transmisión de infecciones, pronta disponibilidad de muestras criopreservadas, bajo riesgo de transmisión viral y baja incidencia de enfermedad de injerto contra huésped (EICH), debido a la inmadurez del sistema inmune del recién nacido. Comparado con el trasplante de MO no emparentado, donde se requiere un grado de identidad completa HLA para los antígenos de clase I y II, la mayoría de los trasplantes de SCU no emparentados se han realizado con uno, dos y tres grados de disparidad HLA.

Los bancos de SCU presentan una amplia diversidad en la metodología utilizada y se ha hecho necesario realizar un esfuerzo de estandarización que contribuya a mejorar la calidad de las unidades almacenadas. Con este propósito se fundó NETCORD en 1998, agrupación formada por bancos de SCU de larga experiencia de USA, Europa, Japón y Australia. Este grupo ha elaborado unos estándares que contemplan regulaciones nacionales e internacionales y que han sido aceptados por los diferentes organismos relacionados con la acreditación (FACHT, JACIE e ISHAGE, entre otras) de este tipo de actividades. A fecha de Julio de 2002, existían 57.676 unidades de SCU almacenadas y hasta la fecha se han realizado más de 2.000 trasplantes de SCU emparentados y no emparentados. El registro EUROCORD trabaja en colaboración con NETCORD y se encarga de recoger los datos de seguimiento de los trasplantes de SCU.

En España, el banco de cordón de Barcelona fue el primero en iniciar sus actividades en 1995, posteriormente se fueron incorporando los bancos de Madrid, Málaga, Galicia, Canarias y Valencia. A fecha de 2001 contaban en su haber con 11.155 unidades de SCU y se habían realizado 133 trasplantes de SCU no emparentado.

En 1998, Rubinstein y col⁴ publicaron los resultados de 562 trasplantes de SCU no emparentado. El seguimiento clínico mostró prendimiento mieloide

en el día 42 para el 81% de los pacientes y prendimiento plaquetar en el día 180 para el 69%. La incidencia de EICH crónica ocurrió solamente en el 12% y fue poco severa. Desde octubre de 1988 hasta marzo de 2000 se han comunicado a EUROCORD los datos de 700 trasplantes procedentes de 121 centros pertenecientes a 29 países. De estos, 150 casos fueron de donante emparentado y 534 de donante no emparentado (378 niños y 156 adultos)⁵. Del análisis de estos resultados se concluye que los trasplantes de SCU HLA idénticos de donante emparentado tienen menos EICH e idéntica supervivencia que los trasplantes de MO en las mismas condiciones. Respecto a los trasplantes de SCU no emparentados, los resultados son similares a los de MO. Una conclusión unánime de estos estudios es que, el factor crucial en el resultado favorable del trasplante es el número de células nucleadas infundidas IKg de peso, aconsejándose una dosis a infundir $> 3 \times 10^7$ /Kg, aunque recientemente en la misma serie de pacientes antes mencionada se comprobó que la dosis de CFC (unidades formadoras de colonias) era un parámetro más predictivo de la supervivencia post-trasplante que la dosis de células nucleadas, observándose prendimiento y trasplante libre de enfermedad a partir de una dosis de 5×10^4 CFCs/Kg⁶.

De entre los hospitales de España que vienen realizando trasplantes de SCU, cabe mencionar al hospital "La Fe" de Valencia, que lleva realizados más de 30 trasplantes. En un trabajo, recientemente publicado por este grupo, se evalúan los resultados de una serie de 22 adultos⁷, de los cuales 12 viven y están libres de enfermedad, aun habiéndoseles infundido una mediana de $1,71 \times 10^7$ células mononucleadas/Kg. Cabe resaltar los mejores resultados con pacientes más jóvenes.

Uno de los principales problemas que plantean los trasplantes de SCU, es la baja celularidad de una unidad de SCU y el retraso del prendimiento mieoide y plaquetar, en comparación con los trasplantes de MO, por lo que la expansión *ex vivo* se vislumbra prometedora, no solo porque aportaría al paciente un número suficiente de PHs que acortarían el período de aplasia, sino porque permitiría su uso en adultos.

Caracterización funcional de los progenitores y células madre hematopoyéticas

El sistema hematopoyético en mamíferos está compuesto por una población heterogénea de células que comprende desde células maduras con una limitada capacidad proliferativa y una vida media corta hasta células pluripotentes con una extensa capacidad proliferativa, de diferenciación y de

auto-renovación, las denominadas células madre hematopoyéticas (CMHs). Por esto las CMHs son definidas por su potencial de auto-renovación y por su capacidad para producir una progenie diferenciada.

La incapacidad de purificarlas a homogeneidad hace necesario el uso de ensayos funcionales.

En el ratón se denominan a las células repobladoras a corto plazo, (STRCs), a aquellas células que previenen de la muerte a los animales irradiados letalmente, mientras que el número de células repobladoras a largo plazo (LTRCs) se estiman por facilitar el trasplante con éxito en un segundo huésped. La medida más definitiva de las LTRCs es su capacidad para competir por el injerto contra otra CMH. Si la repoblación competitiva se efectúa usando números bajos de CMH putativas, es posible determinar la capacidad repobladora de una única célula madre.

Como los experimentos *in vivo* no se pueden realizar en humanos se han desarrollado ensayos que permiten la enumeración de los PHs y de las CMHs. Históricamente, el análisis cuantitativo de los PHs y CMHs se ha visto limitado a ensayos *in vitro*, en los que el potencial proliferativo de las células se evalúa en presencia de varias combinaciones de citocinas. Así, los denominados ensayos clonogénicos, detectan los PHs como células formadoras de colonias (CFCs), que tienen un limitado potencial proliferativo y están comprometidas a un linaje mielóide específico.

Los ensayos *in vitro* que más se aproximan a la detección de las CMHs son los que evalúan la presencia de blastos con capacidad de formar colonias (CFU-blast) y los que detectan células formadoras de colonias con un alto poder proliferativo (HPP-CFC), y los más comúnmente usados, que consisten en cultivos a largo plazo sobre estroma, entre los que se incluyen los denominados LTC-IC, que detectan la presencia de colonias de células denominadas CAFCs, capaces de iniciar la hematopoyesis sobre un estroma a largo plazo, durante 5-7 semanas. Si estos cultivos se prolongan durante más tiempo, hasta 100 días, se denominan prolongadas LTC-IC o ELTC-IC. Sin embargo este tipo de cultivos no permite el desarrollo de todas las estirpes hematopoyéticas y además no valoran la capacidad de repoblación.

Aunque el número de CAFCs se correlaciona con el número de LTRCs, no hay pruebas definitivas de que los progenitores humanos determinados en los ensayos *in vitro* se correlacionen con las LTRCs. Además los ensayos *in vitro* no pueden evaluar la capacidad de anidar, una característica de la CMH que sólo se puede determinar por trasplante.

El descubrimiento de una mutación en el ratón que le confiere una severa inmunodeficiencia combinada (SCID) ha provisto de una valiosa herramienta para evaluar la capacidad de prendimiento de las células hematopo-

yéticas más primitivas, tras trasplante intravenoso. Más recientemente se ha empezado a usar el ratón NOD/SCID (ratón inmunodeficiente diabético no obeso/inmunodeficiencia severa combinada)⁸. Este modelo se usa para identificar una célula madre hematopoyética denominada célula repobladora del ratón SCID (SRC)⁹, que es más primitiva que cualquier otra célula identificada por los anteriores ensayos.

Sin embargo no debemos olvidar que los progenitores hematopoyéticos trasplantados se encuentran en un entorno xenogénico. Como en el ratón, la reconstitución a corto y a largo plazo o el injerto en trasplantes primarios, secundarios e incluso terciarios, miden los progenitores humanos comprometidos y primitivos respectivamente.

Sin embargo no todos los modelos de trasplantes xenogénicos miden el injerto de las células en un estadio similar de diferenciación. Además la mayoría de los modelos xenogénicos no aportan información sobre la naturaleza competitiva de las CMH putativas, como se puede obtener de los ensayos realizados en ratón. Algunos investigadores han examinado las características de las CMHs en perros o en primates no humanos¹⁰. Estos modelos han demostrado que los progenitores definidos *in vitro* difieren de las CMHs que se injertan y que los estudios realizados en ratón sólo predicen en parte los resultados vistos en los animales más grandes.

Caracterización fenotípica de las células madre hematopoyéticas

La mayoría de las CMHs en humanos expresan el antígeno CD34, una proteína integral de membrana de 90-120 kD, que también se expresa en progenitores comprometidos. Se ha sugerido que esta molécula funciona como regulador de la adhesión celular a las células del estroma del microentorno hematopoyético. La frecuencia de las células CD34⁺ en MO se ha estimado entre 1-3% de las células mononucleadas (MNCs), en SCU oscila entre 0.2-1%. Es interesante resaltar que su frecuencia en la SCU disminuye con la edad de gestación. Así, se ha observado que a las 17 semanas de gestación suponen el 11% de las MNCs, mientras que a las 38 semanas son el 1%, aproximadamente. Las células CD34⁺, tanto en MO como en SCU constituyen una población muy heterogénea en la que se incluyen también PHs comprometidos.

La separación celular basada en la co-expresión de otros antígenos ha permitido obtener poblaciones celulares enriquecidas en células más primitivas. Así la expresión del antígeno CD38 aumenta con la diferenciación. Tan sólo entre 1-10% de las células CD34⁺ son CD38⁻. Ambas subpoblaciones CD34⁺CD38⁺ y CD34⁺CD38⁻ contienen CFCs y LTC-ICs^{11,12}, aunque las

LTC-ICs están más enriquecidas en la fracción $CD34^+CD38^-$. Además las ELTC-ICs se encuentran en esta fracción $CD34^+CD38^-$, que además no expresa marcadores de linaje (Lin^-)^{13,14}.

La población celular $CD34^+CD38^-$ es muy quiescente y son necesarias grandes dosis de citocinas, denominadas de acción temprana, tales como Fl, SCF y TPO para llevarlas a ciclo¹⁵.

Las CMHs se encuentran en la subpoblación celular $CD34^+CD38^-Lin^-$. También expresan el CD133¹⁶, el Thy-1 (CD90)¹⁷ y tienen una baja o nula expresión de c-kit (CD117)¹⁸.

En el ratón las CMHs no expresan de manera uniforme el CD34 y sólo durante el desarrollo, tras trasplante o durante la administración de factores de crecimiento son $CD34^+$, habiéndose demostrado la reconstitución total de la hematopoyesis en ratón¹⁹, con tan solo 20 células $Lin^-Sca-1^+c-kit^+CD34^{0/-}$. Esto plantea futuras posibles implicaciones en el prospecto de la purificación y expansión de CMHs sobre la base de la selección del $CD34^+$ como único criterio.

Si las CMH $CD34^-$ son precursores de las $CD34^+$ y por tanto, una fuente mejor de células para trasplante y/o para expansión ex vivo no se sabe con certeza, aunque el trabajo de Bhatia y col²⁰ demuestra que es posible que exista una jerarquía celular en humanos, siendo más primitiva la célula con fenotipo $Lin-CD34^-CD38^-$ que, a diferencia de la antes citada, no expresaría el antígeno Thy-1. Estos autores observan que en cultivo estas células se diferencian a $CD34^+$ y que son capaces de iniciar la hematopoyesis en un ratón NOD/SCID.

Diferencias ontogénicas en las células madre hematopoyéticas

Los resultados obtenidos en los laboratorios y en los ensayos clínicos se deben interpretar a la luz de la ontogenia de las CMHs. Durante la vida fetal y durante la temprana vida post-natal, las CMHs se multiplican in vivo, lo que se traduce en expansión del "pool" de CMHs. Sin embargo durante el desarrollo y a lo largo de la vida pueden ocurrir cambios sutiles en la calidad de las CMHs. Así las CMHs de hígado fetal murino tienen un mayor potencial de proliferación que las de MO post-natal^{21,22}. Además la frecuencia de progenitores que sólo pueden reconstituir la estirpe mieloide o linfoide, pero no ambas, aumenta con la edad²³.

Las CMHs de SCU pueden tener una ventaja competitiva similar, sobre las de MO²⁴. Por célula, las células de SCU injertan de 10 a 50 veces mejor en huéspedes xenogénicos que las de MO²⁵.

Se ha observado también una gradación en la frecuencia de las células $\text{Lin}^- \text{CD34}^+$ con la edad, siendo de 3,25% para hígado fetal, 2,65% para sangre fetal, 1,12% para SCU y 0,28% para MO²⁰. Además se ha demostrado que la frecuencia de las SRC es distinta dependiendo de si se trata de SCU, MO o sangre periférica movilizada, siendo esta de 1 SRC en $0,93 \times 10^6$, de 1 en 3×10^6 y de 1 en 6×10^6 MNCs respectivamente²⁶. No obstante otros autores estiman la frecuencia de las SRC en SCU de 1 SRC en 617 células $\text{CD34}^+ \text{CD38}^-$ y estiman que la frecuencia en MO, aunque no calculada, debe ser similar¹⁴.

En cuanto a la frecuencia de PHs, ésta es similar en SCU y en MO, aunque la proporción de los PHs inmaduros denominados CFU-GM, CFU-GEMM y CFUMk y BFU-E, capaces de generar todas las estirpes mieloides es superior en la SCU²⁷ como lo es también la de las células HPP-CFC²⁸.

No se ha realizado una comparación sistemática entre progenitores de MO de donantes jóvenes y mayores para determinar si los progenitores de una sola estirpe se vuelven más frecuentes con la edad. Sin embargo las CMHs con capacidad de generar una única estirpe son más frecuentes en los injertos humanos tras expansión *ex vivo*, sugiriendo que una pérdida similar en el potencial de las CMHs sucede también en humanos²⁹. La pérdida de la capacidad de proliferación y de diferenciación con la edad debe reflejar la incapacidad de llevar a cabo verdaderas divisiones celulares de autorenovación o senescencia³⁰.

La sangre periférica movilizada por G-CSF se ha convertido en la fuente celular preferida por la temprana recuperación en neutrófilos y plaquetas, debido seguramente al mayor número de STRCs³¹. Sin embargo hay evidencias de que los progenitores son cualitativamente diferentes a los de MO. Así, la capacidad de diferenciación y proliferación de las células $\text{CD34}^+ \text{Lin}^-$ es inferior³², se requiere un mayor número de células para reconstituir la hematopoyesis en modelos de trasplante xenogénico y la capacidad de repoblación a largo plazo es también inferior a la de los progenitores de MO^{33,34}.

Expansión *Ex Vivo* de los progenitores y de las células madre hematopoyéticas

Uno de los intereses más prioritarios, en la investigación en células madre es la expansión *ex vivo* de las CMHs. Las ventajas son múltiples e incluyen: a) disminución del tiempo de recuperación hematopoyética tras quimioterapia o trasplante; b) aumento del componente LTRC de pequeños injertos o injertos de pacientes pre-tratados con quimioterapia; c) eliminación de las células cancerígenas de un injerto, d) modificación genética de las LTRCs y e) gene-

ración *ex vivo* de células dendríticas para su uso como vacunas inmunoterapéuticas.

Para acortar el período de recuperación de neutrófilos y plaquetas, se han dedicado muchos esfuerzos en conseguir expansiones de las STRCs y precursores. Se han desarrollado varios sistemas de cultivo, de uso clínico que usan citocinas combinadas o no con un estroma autólogo que permiten la expansión de las CFUs y precursores mieloides. La transfusión de tales células comprometidas, acorta o incluso elimina la neutropenia post-trasplante^{35,36}.

Otros sistemas en desarrollo tienen como objetivo la expansión de megacariocitos para disminuir la necesidad de los trasplantes de plaquetas³⁷.

Para generar suficientes células a partir de pequeños injertos, tales como la SCU, para la reconstitución de adultos, no es suficiente expandir las STRCs, sino también las LTRCs. Sin embargo, las condiciones que permiten la expansión de las STRCs, conllevan casi siempre la disminución de las LTRCs con capacidad de injerto. Se han realizado pocos ensayos clínicos utilizando solo progenitores expandidos. Además la mayoría de estos ensayos se realizaron usando un injerto autólogo, sin marcaje genético y sin total mieloablación, por lo que el injerto a largo plazo no se pudo evaluar.

Para expandir las CMHs, estas células deben experimentar repetidas divisiones celulares simétricas, en las que las dos células hijas retengan las mismas características de la célula original.

La ausencia de expansión puede ser debida a la incapacidad de división en las condiciones usadas. Aunque la mayoría de las CMHs están en G_0 ³⁸, no hay evidencias de que la falta de expansión sea debida a la incapacidad de llevarlas a ciclo. De hecho, la salida de G_0 , puede en parte ser la responsable de la defectuosa capacidad de repoblación de los injertos expandidos³⁹.

El injerto necesita la anidación de la CMH, seguida de la proliferación *in vivo* y la diferenciación. El cultivo *ex vivo* conlleva cambios en la expresión de los miembros de la familia de la $\beta 1$ integrina, así como del receptor CXCR4, que juega un papel muy importante en la anidación y el injerto⁴⁰.

La falta de expansión puede también ser debida a la muerte celular, así la expansión *ex vivo* está asociada con aumento de la expresión del ligando de Fas (CD95)⁴¹, y la disminución de la expresión del gen anti-apoptosis *Bcl2*⁴² en las células CD34⁺, mientras que la eliminación de los factores de crecimiento activa la vía de las caspasas⁴³ en las células CD34⁺. Por lo tanto un exceso de apoptosis de las células hijas durante o después de la expansión, puede contribuir a una pobre expansión e incluso pérdida de las CMHs.

Una tercera posibilidad es que la progenie de las CMHs se vuelva progresivamente más comprometida y pierda su capacidad de LTRC. Algunos

investigadores han argumentado que la decisión de auto-renovación sin diferenciación es estocástica. Si esto fuera verdad ningún factor podría alterar las decisiones de las CMHs. Sin embargo la activación de ciertos genes, como más adelante se comenta, aumenta la capacidad de auto-renovación. Así por ejemplo la sobre-expresión del gen homeobox *Hoxb4*, en CMHs de ratón conlleva a la expansión del "pool de CMHs *in vivo* e *in vitro*"⁴⁴. No se sabe todavía que señales activan la expresión de este gen. Sin embargo estos estudios otorgan cierta credibilidad a la idea de que deben existir en el microentorno y deben activar la decisión de las CMHs.

Se ha observado expansión de las STRCs y una modesta expansión de las células que establecen la hematopoyesis en segundos huéspedes, cuando el cultivo se realiza en presencia de combinaciones de citocinas muy potentes, tales como SCF, FL, TPO e IL-6^{45,46,47,48}, aunque también se ha observado defectos en el potencial de injerto, cuando compiten contra células no manipuladas, lo que sugiere que las citocinas, como único estímulo, no permiten las divisiones celulares sin pérdida de capacidad de repoblación.

El efecto de las citocinas sobre los progenitores está modulado por componentes de la matriz extracelular, por lo que la co-localización selectiva de las citocinas y progenitores debe ser crucial para la regulación de la proliferación y la diferenciación, aunque todavía no se sabe como recrear tales interacciones en cultivo.

Finalmente, si citocinas, consideradas clásicamente como no hematopoyéticas, tales como las proteínas morfogenéticas, juegan un papel durante el desarrollo hematopoyético está por resolver⁴⁹.

En los estromas que soportan las LTRCs, existen otra serie de factores, además de las citocinas, y que se expresan de manera diferencial, por ejemplo los ligandos de los receptores de la familia Notch⁵⁰, que juegan un papel clave en los procesos de decisión celular en los sistemas no hematopoyéticos. Es de vital importancia identificar dichos factores, para los que existen receptores en las CMHs, para así determinar que señales activan la auto-renovación de las CMHs.

Dado que las células madre y las células cancerígenas tienen la capacidad de auto-renovarse, parece razonable que utilicen una estrategia similar. Por ejemplo, la prevención de la apoptosis por sobre-expresión del gen *bcl-2* conlleva un aumento de las CMHs *in vivo*, sugiriendo que la muerte celular tiene un papel en la regulación de la homeostasis de las CMHs⁵¹.

Otras vías de señalización asociadas con la oncogénesis tales como las de Notch, antes mencionada, Sonic hedgehog (Shh) y Wnt pueden regular también la auto-renovación celular. La activación de Notch en las CMHs en cultivo aumenta de manera consistente la cantidad de progenitores primitivos

tanto *in vitro* como *in vivo*, sugiriendo que promueve la auto-renovación o que al menos mantiene la multipotencialidad^{52,53}.

También se ha observado que la población enriquecida en CMHs (CD34⁺ Lin⁻CD38⁻) aumenta su capacidad de auto-renovación en respuesta a la estimulación de Shh, aunque en combinación con factores de crecimiento⁵⁴.

La implicación de estos dos genes es especialmente interesante a la luz de otros estudios que implican estas vías en la regulación de las células madre de otros tejidos.

De particular interés es la vía de Wnt. Las proteínas Wnt son moléculas de señalización intercelulares que regulan el desarrollo en varios organismos. La expresión de proteínas Wnt en MO⁵⁵ sugiere que, también deben influir en las CMHs. Así, se ha demostrado que la sobre-expresión de β -catenina (un activador de la señalización por Wnt) en cultivos a largo término de CMHs expande un "pool" de CMHs determinado tanto por el fenotipo (Thy1.1^{lo} Lin^{-/lo} Sca1⁺ c-kit⁺) como por su función (capacidad de reconstituir el sistema hematopoyético *in vivo*). Además la expresión ectópica de axina, un inhibidor de la señalización por Wnt, conlleva una inhibición de la proliferación de las CMHs, aumento de la muerte *in vitro* y reducida capacidad de reconstituir *in vivo*⁵⁶.

Aplicaciones terapéuticas de la transferencia génica en las CMHs

Desde hace dos décadas se ha propuesto que la transferencia génica en las CMHs puede ser una herramienta para el tratamiento de las enfermedades genéticas y para enfermedades neurodegenerativas, autoinmunes, cáncer y más tarde el SIDA, y para corregir o modular el sistema inmunitario.

Todos los vectores utilizados para el desarrollo de modelos de terapia génica se han generado con vectores virales, predominantemente onco-retrovirus. Estos vectores requieren para su integración en el genoma de la célula huésped, que ésta se replique y las CMHs se encuentran en un estado quiescente, por lo que estas estrategias requieren del uso de protocolos de expansión, con las dificultades que ello conlleva, como antes se ha mencionado.

El descubrimiento y desarrollo de nuevos vectores derivados del HIV posiblemente aceleren el progreso en este campo. Esta familia de lentivirus puede transducir células tanto en estado de división celular como de quiescencia⁵⁷. Sin embargo, por razones de seguridad, se trata de un patógeno humano, no se ha aprobado ningún ensayo clínico.

Otras estrategias como las denominadas "transcriptional targetting", consistentes en la inserción de: secuencias reguladoras en los vectores que con-

trolen la transcripción y confinen la expresión del transgen a una estirpe celular específica después de la diferenciación celular, parecen más prometedoras.

Inmunodeficiencias congénitas y adquiridas.

En Julio de 1990, se aprobaron por los "National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee" dos protocolos de terapia génica para la variante de SCID, ADA-SCID y melanoma. Ambos protocolos incluían transferencia génica en células linfoides. Dos años más tarde se inició el primer ensayo de transferencia génica con CMHs para ADA-SCID⁵⁸, y después se han realizado otros estudios, incluyendo transferencia génica en CMHs de SCU⁵⁹. Los resultados demuestran claramente la persistencia de células genéticamente marcadas. Sin embargo, la disponibilidad de un tratamiento alternativo y el uso concomitante en todos estos pacientes de la enzima pegilada ADA, ha dificultado la evaluación de los efectos terapéuticos de la terapia génica. Si bien es cierto que la terapia combinada fue superior en algunos pacientes al uso exclusivo de la enzima. En el estudio de terapia génica realizado con CMHs de SCU, la deprivación de la enzima conllevó aun acúmulo de linfocitos T con una expresión normal de ADA pero no se mantuvo la función inmune⁵⁹. Sin embargo en el estudio realizado con linfocitos transducidos, las células T modificadas reemplazaron progresivamente a las no transducidas⁶⁰.

A pesar de los datos esperanzadores obtenidos a partir de modelos animales para las inmunodeficiencias congénitas, como por ejemplo Jak3-SCID deficiencia, síndrome de Wiskott-Aldrich y deficiencia en RAG (recombination-activating gene), la aplicación clínica se ha visto limitada a la granulomatosis crónica y SCID-X1. Los resultados obtenidos con la terapia génica para SCIDX1 han sido la primera demostración formal de que la terapia génica con CMHs⁶¹ podía curar una enfermedad genética.

Enfermedades autoinmunes.

El conocimiento que se tiene de la patogénesis de las enfermedades autoinmunes ha llevado al desarrollo de varias aproximaciones de terapia génica en estos últimos años, incluyendo la modulación de las respuestas a citocinas para reprogramar al sistema inmune, administración de vacunas anti-idiotipo y la reinducción de la tolerancia. Para una revisión⁶².

Terapia inmunogenética del cáncer.

El cáncer, en particular aquellos tumores tratados con trasplante autólogo de médula ósea, fue una de las primeras aplicaciones clínicas para la terapia génica. Inicialmente los objetivos principales estaban dirigidos a definir el origen de la recaída del tumor y la eficiencia de la transferencia génica. En los años siguientes, el uso de la terapia génica en el tratamiento del cáncer se ha extendido, habiéndose convertido en una de las principales aplicaciones preclínicas y clínicas de este tipo de terapia.

La mayoría de las aproximaciones de la terapia inmuno-genética para el tratamiento del cáncer han tenido como finalidad aumentar la inmunogenicidad de las células tumorales, para que el sistema inmunitario pueda eliminar las células residuales del tumor, independientemente del procedimiento utilizado para extirpar la masa tumoral.

La inmunoterapia génica incluye la transferencia de los genes que codifican para el complejo principal de histocompatibilidad, moléculas co-estimuladoras, citocinas y quimiocinas en las células tumorales para convertirlas en células dendríticas o células presentadoras de antígeno profesionales.

Generación de células dendríticas.

Las células dendríticas (CDs) son las únicas células capaces de presentar antígenos extraños a los linfocitos T vírgenes, de estimularlos y educarlos en linfocitos T de memoria, que cuando reconocen ulteriormente los antígenos presentados, van a transformarse en linfocitos T citolíticos⁶³. Por lo tanto, una de las formas de vacunación antitumoral que se está desarrollando trata de producir in vitro células dendríticas autólogas sensibilizadas con el antígeno tumoral específico del tumor propio del paciente e infundirlas de manera repetida constituyendo una vacuna que pueda desencadenar in vitro la respuesta inmune capaz de rechazar el tumor⁶⁴.

Muchos antígenos de tumores no provocan una respuesta T antígenoespecífica en los pacientes, lo que puede ser debido a una ausencia de CDs funcionales en los tejidos tumorales. También los tumores pueden excretar factores que inhiben o reducen la función de las CDs y así escapar al sistema inmune. Un linfocito T CD8 necesita recibir dos señales para ser activado: la primera se realiza por la unión del complejo molécula HLA/péptido antigénico con el TCR (T cell receptor) del linfocito T, la segunda consiste en la unión de las moléculas 87 con el receptor CD28/CTLA4 del linfocito y la unión del CD40 con el ligando del CD40 en el linfocito T. Sin embargo en la

mayoría de los tumores humanos, las moléculas necesarias para inducir la segunda señal de activación están ausentes, lo que impide una estimulación eficaz de los linfocitos T.

La manera de superar estas anomalías es manipular las CDs *in vitro* y tratar de conseguir la respuesta inmune por la infusión de éstas, presentando el antígeno tumoral a los linfocitos T por las CDs.

Las CDs se encuentran en cantidades muy escasas en la sangre (<1% de las células mononucleares) y por lo tanto son difíciles de aislar: Hasta hace poco, esta escasez y la ausencia de marcadores específicos de las CDs había impedido el desarrollo de investigaciones. La posibilidad de poder producir las *in vitro*, además de su caracterización, ha permitido su utilización en clínica. Las técnicas de cultivo usan monocitos de sangre periférica y SCU o células CD34⁺ de MO y SCU.

La captura del antígeno por las CDs ocurre por fagocitosis y por macropinocitosis. Estos antígenos van a ser procesados en pequeños fragmentos que se asociarán con las moléculas HLA y migrarán a la superficie de la célula.

Los vectores que se están utilizando para cargar las CDs con los antígenos tumorales son muchos: vectores virales, ADN desnudo o en plásmidos, ARN, liposomas con proteína o ácido nucleico, células tumorales lisadas, células apoptóticas o péptidos. En la actualidad se están llevando a cabo ensayos en pacientes con linfoma no Hodgkin y distintos cánceres: de próstata, colorectal, renal, microcítico de pulmón, de mama, de ovario, de cérvix, hepático y gástrico, utilizando en todos ellos CDs derivadas de monocitos autólogos^{65,66}.

Sin embargo, es la transferencia génica en las CMHs, con la finalidad de producir CDs que expresen el antígeno asociado al tumor *ex vivo* o *in vivo*, la que se ha convertido en una de las áreas de investigación más importantes de la terapia inmuno-genética del cáncer. La ingeniería genética tiene las ventajas de una expresión sostenida y permanente del antígeno y el consiguiente establecimiento de una persistente respuesta antitumoral.

Es obvio que se necesita conocer la biología básica de las CMHs para comprender los mecanismos moleculares y celulares implicados en los procesos de auto-renovación y diferenciación para de este modo comprender los orígenes de las enfermedades hematológicas y desarrollar estrategias que permitan una expresión génica eficiente en esas células para su uso en terapias génicas.

Referencias

1. Knudtson S. In vitro growth of granulocyte colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood* 43: 357-361 (1974).
2. Nakahata T, Ogawa M. Hemopoietic colony-forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono- and multipotential hemopoietic progenitors. *J Clin Invest* 70: 1324 (1982).
3. Gluckman E. Et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 321:1174 (1989).
4. Rubinstein P et al. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med*. 339: 1565-1577 (1998).
5. Gluckman E. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 28: 1197-1205 (2000).
6. Migliaccio AR et al. Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity. *Blood* 96: 2717-2722 (2000).
7. Sanz GF et al. Standardized, unrelated donor cord blood transplantation in adults with hematologic malignancies. *Blood* 98: 2332-2338 (2001).
8. Dale L, Hesselton RA, Shultz L SCID mouse models of human stem cell engraftment. *Stem Cells* 16: 166-177 (1998).
9. Lapidot T, et al. Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. *Science* 255: 1137-1141 (1992).
10. Donahue RE, Dunbar CE. Update on the use of nonhuman primate models for preclinical testing of gene therapy approaches targeting hematopoietic cells. *Hum Gene Ther* 10: 607-617 (2001).
11. Hao Q-L, Thiemann FT, Smogorzewska EM, Crooks GM. Extended long-term culture reveals a highly quiescent and primitive human hematopoietic progenitor population. *Blood*; 88: 3306-3313 (1996).
12. Hao QL, Shah AJ, Thiemann FT, et al. A functional comparison of CD34+CD38 cells in cord blood and bone marrow. *Blood*; 86:3745-3753 (1995).
13. Larochelle A, Vornoor J, Hanenberg H, et al. Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat Med*; 2:1329-1337 (1996).
14. Bhatia M, Wang JC, Kapp U, et al. Purification of primitive hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*;94:53205325 (1997).
15. Oh I-H, Lau A, Eaves CJ. During ontogeny primitive (CD34+CD38-) hematopoietic cells showed altered expression of a subset of genes associated with early cytokine and differentiation responses of their adult counterparts. *Blood*; 96:4160-4168 (2000).
16. Yin AH et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90: 5002-5012 (1997).
17. Murray L et al. Enrichment of human hematopoietic stem cell activity in the CD34+ Thy-1+Lin- subpopulation from mobilized peripheral blood. *Blood* 85:368(1995).
18. Kawashima I et al. CD34+ human marrow cells that express low levels of kit protein are enriched for long-term marrow-engrafting cells. *Blood* 87:4136-4162 (1996).
19. Osawa M, et al. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34^{low}/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273: 242-245 (1996).

20. Bhatia M, et al. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nature Med.* 4:1038-1045 (1998).
21. Rebel VI, Miller CL, Eaves CJ, Landsdorp PM. The repopulation potential of fetal liver hematopoietic stem cells in mice exceeds that of their liver adult bone marrow counterparts. *Blood* 87:3500-3507 (1996).
22. Szilvassy SJ, Meyerrose TEJ, Ragland PL, Grimes B. differential homing and engraftment properties of hematopoietic progenitor cells from murine bone marrow, mobilized peripheral blood, and fetal liver. *Blood* 98:2108-2115 (2001).
23. Sudo K, Ema H, Morita H, Nakauchi H. Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 192:1273-1280 (2000).
24. Rosler ES, Brandt JE, Chute J, Hoffman R. An in vivo competitive repopulation assay for various sources of human hematopoietic stem cells. *Blood* 96:3414-3421 (2000).
25. Holyoake TL, Nicolini FE, Eaves CJ. Functional differences between transplantable human hematopoietic stem cells from fetal liver cord blood, and adult marrow. *Exp Hematol* 27:1418-1427 (1999).
26. Wang JCY, Doedens M, Dick JE. Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay. *Blood* 89:3919-3924 (1997).
27. Mayani H et al. Kinetics of hematopoiesis in Dexter-type long-term cultures established from human umbilical cord blood cells. *Stem Cells* 16:127-135 (1998).
28. Lu L et al. Enrichment, characterization and responsiveness of single primitive CD34⁺⁺⁺ human umbilical cord blood hematopoietic progenitors with high proliferative and replating potential. *Blood* 81: 41-48 (1993).
29. Glimm H et al. Previously undetected human hematopoietic cell populations with short-term repopulating activity selectively engraft NOD/SCID-132 microglobulin-null mice. *J Clin Invest* 107:199-206 (2001).
30. Geiger H, Van Zant G. The aging of lympho-hematopoietic stem cells. *Nature Immunology* 3:329-333 (2002).
31. Korbling M, Anderlini P. Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation does the source of hematopoietic stem cells matter? *Blood* 98:2900-2908 (2001).
32. Prosper F, Stroncek D, Verfaillie CM. Phenotypic and functional characterization of long-term culture-initiating cells present in peripheral blood progenitor collections of normal donors treated with granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*, 88:2033-2042 (1996).
33. Verfaillie CM et al. Kinetics of engraftment of CD34⁻ and CD34⁺ cells from mobilized blood differs from that of CD34⁻ and CD34⁺ cells from bone marrow. *Exp Hematol* 28:1071-1079 (2000).
34. Van der Loo JC et al. Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) mouse as a model system to study the engraftment and mobilization of human peripheral blood stem cells. *Blood* 92:2556-2570 (1998).
35. Stiff P et al. Autologous transplantation of ex vivo expanded bone marrow cells grown from small aliquots after high-dose chemotherapy for breast cancer. *Blood* 95:2169-2174 (2000).
36. McNiece I, Briddell R. Ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells and mature cells. *Exp Hematol* 29:3-11 (2001).
37. Bertolini F et al. Megakaryocytic progenitors can be generated ex vivo and safely administered to autologous peripheral blood progenitor cell transplant recipients. *Blood* 89:2679-2688 (1997).
38. Gothot A et al. Functional heterogeneity of human CD34⁺ cells isolated in subcompartments of the G₀/G₁ phase of the cell cycle. *Blood* 90: 4384-4393 (1997).

39. Habibian HK et al. The fluctuating phenotype of the lymphohematopoietic stem cell with cell cycle transit. *J Exp Med* 188:393-398 (1998).
40. Glimm H, Oh IH, Eaves CJ. Human hematopoietic stem cells stimulated to proliferate in vitro lose engraftment potential during their S/G2/M transit and do not reenter GO. *Blood* 96:4185-4193 (2000).
41. Takenaka K et al. In vitro expansion of hematopoietic progenitor cells induces functional expression of Fas antigen (CD95). *Blood* 88:2871-2877 (1996).
42. Domen J, Cheshier SH, Weissman IL. The role of apoptosis in the regulation of hematopoietic stem cells: Overexpression of Bcl-2 increases both their number and repopulation potential. *J Exp Med* 191 :253-264 (2000).
43. Wang LS et al. Expresión and activation of caspase-3/ CPP32 in CD34+ cord blood cells is linked to apoptosis after growth factor withdrawal. *Exp Hematol* 28:907-915 (2000).
44. Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation. *Exp Hematol* 29: 1125-1134 (2001).
45. Bhatia M et al. Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short term ex vivo culture. *J Exp Med* 186: 619-624 (1997).
46. Conneally E, Cashman J, Petzer A, Eaves C. Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:9836 (1997).
47. Piacibello W et al. Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34+ cord blood cells after ex vivo expansion: evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells. *Blood* 93:3736-3749 (1999).
48. Kollet O et al. The soluble interleukin-6 (IL-6) receptor/IL-6 fusion protein enhances in vitro maintenance and proliferation of human CD34+CD38-/low cells capable of repopulating severe combined immunodeficiency mice. *Blood* 94:923-931 (1999).
49. Bhatia M et al. Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 189: 1139-1148 (1999).
50. Li L et al. The human homologue of rat Jagged1 expressed by marrow stroma inhibits differentiation of 32D cells through interaction with Notch1. *Immunity* 8:43-55 (1998).
51. Domen, J, Gandy KL, Weissman IL. Systemic overexpression of BCL-2 in the hematopoietic system protects transgenic mice from the consequences of lethal irradiation. *Blood* 91: 2272-2282 (1998).
52. Vamum-Finney B et al. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch 1 signaling. *Nature Med.* 6: 1278-1281 (2000).
53. Karanu FN et al. The Notch ligand Jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 192: 1365-1372 (2000).
54. Bhardwaj G et al. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nature Immunol.* 2:172-180 (2001).
55. Reya T et al. Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity* 13:15-24 (2000).
56. Reya T et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414:105-111 (2001)
57. Woods NB et al. Lentiviral gene transfer into primary and secondary NOD/SCID repopulating cells. *Blood* 96: 3725-3733 (2000).
58. Blaese RM et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270: 475-480 (1995).

59. Kohn DB et al. T lymphocytes with a normal ADA gene accumulate after transplantation of transduced autologous umbilical cord blood CD34+ cells in ADA-deficient SCID neonates. *Nat Med* 4:775-780 (1998).
60. Aiuti A et al. Immune reconstitution in ADA-SCID after PBL gene therapy and discontinuation of enzyme replacement. *Nat Med* 8:423-425 (2002)
61. Cavazzana-Calvo M et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288:669-672 (2000).
62. Bordignon C, Roncarolo MG. Therapeutic applications for hematopoietic stem cell gene transfer. *Nature Immunology* 4:318-321 (2002).
63. Banchereau J et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767-811 (2000).
64. Fong L, Engleman EG. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 18:245-273 (2000)
65. Dallal RM, Lotze MT. The dendritic cell and human cancer vaccines. *Curr Opin Immunol* 12: 583-588 (2000).
66. Reid CDL. Dendritic cells and immunotherapy for malignant disease. *Br J Haematol* 112:874-887 (2001).