
Inmunoterapia celular para modular la respuesta inflamatoria

D. Benítez-Ribas

CIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona

Resumen: *El tipo de respuesta generada por determinados componentes del sistema inmunitario desempeña un papel clave en el origen o el mantenimiento de enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias crónicas. Estas afecciones se caracterizan principalmente por una pérdida de tolerancia a autoantígenos o antígenos no patógenos que conlleva una activación inadecuada del sistema inmunitario. Esta activación inapropiada ocasiona de manera frecuente daño a uno o múltiples órganos, afectando a su función. No están plenamente establecidas las causas que originan y mantienen estas respuestas inmunitarias anómalas. La aproximación terapéutica para estas enfermedades se basa, en general, en inmunomoduladores inespecíficos y agentes biológicos administrados sistémicamente. Una modulación más específica, en el tejido afectado, del tipo de respuesta inmunitaria mediante citocinas, anticuerpos monoclonales o terapia celular, representa una aproximación terapéutica altamente atractiva y con gran potencial. Las células dendríticas son las células presentadoras de antígeno más potentes descritas y tienen la propiedad de regular la generación de la respuesta, sea inmunitaria o tolerogénica, dependiendo del contexto en que se produce la interacción del antígeno y la célula, entre otros factores. Debido a la plasticidad funcional, la capacidad de generar respuestas inmunitarias altamente específicas y la posibilidad de obtener células dendríticas in vitro, en condiciones adecuadas para su aplicación clínica, estas células están siendo utilizadas para el tratamiento de tumores o infecciones, con resultados esperanzadores. La obtención de células dendríticas con actividad tolerogénica y los resultados obtenidos con su uso en modelos experimentales sugieren que el tratamiento con células dendríticas tolerogénicas podría representar una alternativa terapéutica para las enfermedades autoinmunitarias y las enfermedades inflamatorias crónicas de base inmunitaria.*

Palabras clave: Inmunoterapia – Terapia celular – Células dendríticas – Enfermedades autoinmunitarias – Tolerancia – Enfermedades inflamatorias crónicas.

Introducción

Las células dendríticas constituyen un grupo heterogéneo de células presentadoras de antígeno, que están involucradas en la regulación de los fenómenos de inmunidad y de tolerancia. La respuesta inmunitaria adaptativa puede ser inmunogénica, que confiere al individuo resistencia a las infecciones y al cáncer, o tolerogénica, en la cual se atenúan o inhiben las respuestas contra antígenos no patógenos.

Los defectos en la regulación de la inducción de tolerancia resultan en situaciones patológicas tales como el rechazo en los trasplantes, la aparición de enfermedades autoinmunitarias o mediadas por la inmunidad, y las alergias. Una vez que las células dendríticas han reconocido y fagocitado agentes patógenos, sufren una serie de transformaciones fenotípicas y funcionales en un proceso complejo, conocido como maduración. La maduración provoca la migración de las células dendríticas desde los

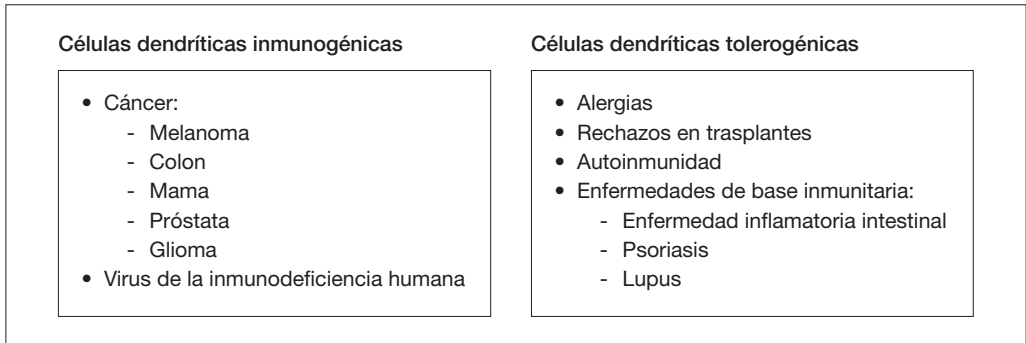


Figura 1. Uso (o posible uso) clínico de las células dendríticas en humanos.

tejidos periféricos hacia los ganglios linfáticos y la presentación de antígenos fagocitados y procesados a los linfocitos T específicos, la interacción con linfocitos B y otros tipos de células dendríticas residentes en el ganglio. Así mismo, durante el proceso de maduración, las células dendríticas expresan en su membrana moléculas implicadas en la interacción y la activación de los linfocitos T (moléculas presentadoras de antígeno y moléculas coestimuladoras), así como la secreción de citocinas proinflamatorias (interleucina [IL] 12, factor de necrosis tumoral alfa [TNF- α]). Las células dendríticas desempeñan, pues, un papel crucial en el inicio y en el tipo de respuesta inmunitaria desencadenada. Debido a las propiedades fisiológicas de las células dendríticas,

que las hacen únicas, y a la posibilidad de su generación *in vitro* utilizando reactivos manufacturados en grado clínico, se han utilizado en ensayos clínicos en humanos con el objetivo de generar respuestas inmunogénicas contra tumores e infecciones (Fig. 1).¹ A pesar de las posibilidades que ofrecen las terapias celulares con células dendríticas en los pacientes con cáncer, hasta la actualidad no se ha explorado la capacidad tolerogénica de estas células en ensayos clínicos.

En la mayor parte de los ensayos clínicos con células dendríticas se han utilizado monocitos (CD14+) como células precursoras, debido a la relativa facilidad de su obtención a partir de sangre periférica respecto a otro tipo de células dendríticas, así como al alto

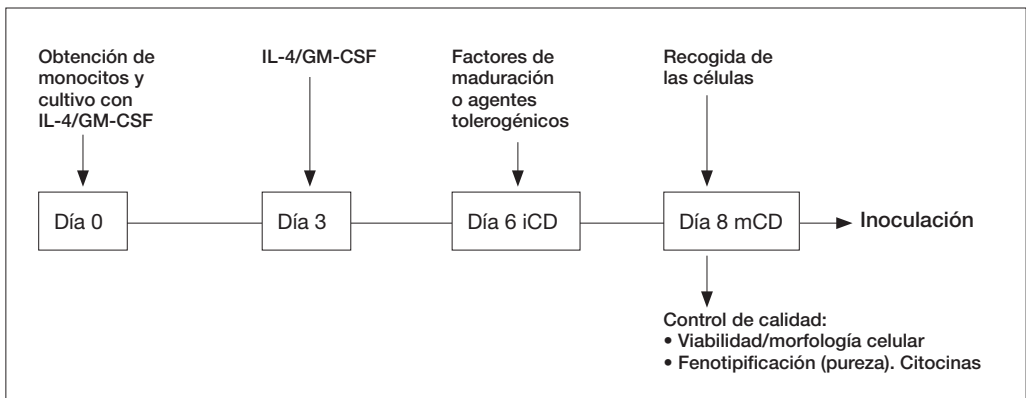


Figura 2. Esquema general para la obtención de células dendríticas a partir de monocitos.

número de células obtenidas² en comparación con la purificación directa de células dendríticas circulantes (Fig. 2). Algunos ensayos han utilizado células dendríticas circulantes para el tratamiento de tumores, lo que supone una mayor complejidad de manipulación al tener que partir de un volumen muy grande de sangre periférica, o bien se han utilizado células dendríticas generadas a partir de precursores CD34+.³ La selección de las diferentes poblaciones de células dendríticas en terapias celulares podría ser de gran relevancia dependiendo del tipo de respuesta inmunitaria que se desee obtener, y que se basa en las diferencias funcionales existentes entre las subpoblaciones.^{4,5}

La respuesta inmunitaria en la enfermedad inflamatoria intestinal

En los pacientes con enfermedad de Crohn se ha determinado que la expansión y la activación incontrolada de linfocitos T con un perfil de citocinas de tipo Th1 (secretoras de interferón gamma [IFN- γ]) está relacionada con una producción aumentada de IL-12, citocina producida a su vez por las células dendríticas activadas y localizadas en la mucosa intestinal. La IL-12 tiene un efecto positivo en la expansión de los linfocitos T de tipo Th1, con lo que se genera un bucle de retroalimentación positiva que cronifica la respuesta inflamatoria. Recientemente, el interés científico también se ha centrado en la IL-23, una citocina heterodimérica que comparte con la IL-12 la subunidad p40. La IL-23 está implicada en la expansión de una subpoblación de linfocitos T descritos como Th17, que se caracterizan principalmente por la secreción de IL-17. Parece que tanto los linfocitos Th1 como los Th17 están íntimamente relacionados con la enfermedad de Crohn, aunque aún está por clarificar el papel que desempeñan en la fisiopatología de la enfermedad.⁶ Además, otra población de linfocitos T con capacidad reguladora, las células T reguladoras (Treg), caracterizadas por la expresión del factor de transcripción FOXP3, son cruciales para el

mantenimiento de la integridad del tracto digestivo, debido a que son capaces de modular y bloquear respuestas inmunitarias no específicas.⁷ En resumen, la enfermedad de Crohn se caracteriza por un desarrollo anómalo de linfocitos T CD4 efectores en respuesta a antígenos no patógenos que se mantiene por retroalimentación positiva con las citocinas secretadas por las células dendríticas activadas. El objetivo de los futuros tratamientos para la enfermedad de Crohn debería centrarse en interrumpir esa alimentación positiva entre el linfocito T-CD que mantiene la inflamación crónica de la mucosa, sea por el incremento del número de Treg o disminuyendo el número de linfocitos CD4 efectores, o por ambos medios.

Células dendríticas tolerogénicas

El silenciamiento de las respuestas inmunitarias contra antígenos propios o no patógenos viene mediado principalmente por las células dendríticas. Cada vez hay más evidencias que apuntan hacia una plasticidad funcional de las células dendríticas dependiendo del contexto en que tenga lugar la respuesta más que de la presencia específica de una población de células dendríticas con una función tolerogénica predeterminada y única. La aplicación terapéutica de células dendríticas requiere la generación in vitro de estas células con un fenotipo tolerogénico estable, en un proceso que sea reproducible y que permita obtener células con alta pureza y viabilidad, aspectos indispensables para su aplicación clínica. Una alternativa para la generación de células dendríticas tolerogénicas es el proceso que consiste en tratarlas con agentes tolerogénicos durante su cultivo en el laboratorio y posteriormente madurarlas mediante estímulos.

Para la obtención in vitro de células dendríticas tolerogénicas se han descrito diversos agentes inmunosupresores (Tabla I), que incluyen corticosteroides (principalmente dexametasona),⁸ vitamina D3,⁹ rapamicina,¹⁰ micofenolato,¹¹ neuropéptidos (péptido intestinal vasoactivo [VIP])¹² o rIL-10;¹³ todos

TABLA I. Compuestos utilizados en la generación de células dendríticas tolerogénicas.

- Agentes inmunosupresores o antiinflamatorios:
 - Corticosteroides (dexametasona)
 - Vitamina D3
 - Ácido micofenólico
 - Rapamicina
- Compuestos químicos:
 - AMPc
 - Prostaglandinas
 - Histamina
 - Neuropeptidos
- Citocinas antiinflamatorias:
 - rhIL-10
 - TGF- β

estos agentes se han utilizado en la generación de células dendríticas resistentes a la maduración. Los protocolos de obtención de células dendríticas tolerogénicas se basan, en general, en la purificación de monocitos de sangre periférica y su posterior cultivo en presencia de citocinas de diferenciación y crecimiento, IL-4 y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF),¹⁴ con la presencia de uno o varios agentes inmunosupresores.

No se ha descrito ningún marcador específico de células dendríticas tolerogénicas que permita su rápida identificación tanto in vivo como in vitro. La falta de un marcador específico hace que su caracterización se base en las propiedades funcionales de las células. Principalmente se utiliza la respuesta alogénica como indicador de su baja inmunogenicidad. Otra característica de las células dendríticas tolerogénicas es la elevada producción de IL-10 respecto a IL-12 en respuesta a estímulos activadores, como podría ser el lipopolisacárido. La identificación del fenotipo de las células, expresión moderada de moléculas asociadas a la maduración (moléculas coes-

timuladoras; CD80, CD83 y CD86), también nos proporciona información sobre su perfil tolerogénico. Un estudio exhaustivo de las propiedades tolerogénicas de las células dendríticas obtenidas constituirá una garantía de calidad para utilizarlas en pacientes.

Aplicación terapéutica de las células dendríticas tolerogénicas

Las propiedades tolerogénicas de las células dendríticas se han documentado en humanos,¹⁵ en voluntarios sanos, en un estudio que ha proporcionado la prueba de concepto de que es posible inducir tolerancia antigénica sistémica en los linfocitos T específicos. Sin embargo, un punto crítico en el diseño de terapias basadas en células dendríticas inmaduras es la estabilidad de estas células en un ambiente proinflamatorio como es el de las enfermedades inflamatorias. Por consiguiente, las células dendríticas inmaduras no serían lo bastante seguras para su uso terapéutico en las afecciones que cursan con inflamación crónica, principalmente debido a la capacidad de estas células para responder a los estímulos inflamatorios. La respuesta inmunitaria inapropiada a autoantígenos en pacientes genéticamente predispuestos puede dar lugar a enfermedades autoinmunitarias o mediadas por la inmunidad. Se acepta que uno de los aspectos fundamentales que son causa de fenómenos de autoinmunidad es la producción aumentada de una o varias citocinas específicas, en cuyo proceso intervienen las células dendríticas.¹⁶ Así, por ejemplo, el TNF- α es una citocina clave en la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn y la psoriasis, y su bloqueo con anticuerpos específicos o receptores solubles logra resultados terapéuticos significativos. En la psoriasis, las células dendríticas aisladas de piel afectada son la mayor fuente de producción de TNF- α .¹⁷ Las células dendríticas plasmacitoides y el IFN tipo I se han propuesto también como patógenos en otras enfermedades como el lupus, la psoriasis, la dermatomiositis y el síndrome de Sjögren.¹⁶ Además de in-

ducir autoinmunidad, las células dendríticas son dianas y están implicadas también en la respuesta terapéutica a distintos fármacos: 1) los corticosteroides inhiben la función y el número de células dendríticas inmunogénicas; 2) la azatioprina/mercaptipurina modula la respuesta inmunitaria derivándola hacia una respuesta tolerogénica; y 3) las terapias que activan la formación de células Treg pueden suprimir también la activación de células dendríticas inmunogénicas.¹⁸

No existen documentados, hasta la fecha, ensayos clínicos en humanos que hayan evaluado el tratamiento con células dendríticas tolerogénicas. Sin embargo, sí se han llevado a cabo estudios en modelos animales, como por ejemplo de artritis reumatoide y de colitis, en los cuales se han demostrado unos importantes efectos terapéuticos. En un modelo animal de artritis reumatoide se inyectaron por vía intravenosa tres dosis de células dendríticas tolerogénicas (obtenidas de médula ósea y generadas con dexametasona y vitamina D3), células dendríticas maduras o solución salina fisiológica. Las células dendríticas tolerogénicas obtenidas mostraron un fenotipo semimaduro, produjeron pocas citocinas proinflamatorias y mostraron una baja capacidad estimuladora de células T. Tras la inyección, los ratones tratados con células dendríticas tolerogénicas mostraron una mejoría en la gravedad y la progresión de la artritis, a diferencia de los ratones tratados con células dendríticas maduras o solución salina fisiológica. La mejoría coincidió con un descenso significativo de Th17 y una elevación de CD4+ productoras de IL-10.¹⁹

Modulación de la respuesta inflamatoria en la enfermedad de Crohn

La enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria crónica incurable que puede afectar a cualquier parte del tracto digestivo y que se caracteriza por dolor abdominal, diarrea, rectorragias, pérdida de peso, náuseas y vómitos, y retraso de crecimiento en los

niños; además, tiene una repercusión social muy importante para los pacientes. El curso de la enfermedad es intermitente, con fases de actividad y de remisión. Aunque la causa es desconocida, hay evidencias de que se produce una pérdida o una alteración de la tolerancia a antígenos de la luz intestinal. Un desequilibrio de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, de células Th1 y de células T efectoras/reguladoras ocasiona un desequilibrio en la homeostasis inmunitaria y da lugar al desarrollo de respuestas inflamatorias exageradas y crónicas.

El tratamiento actual de la enfermedad de Crohn va dirigido a reducir la inflamación y tratar los signos y síntomas de la enfermedad, y se centra en el uso de corticosteroides, inmunomoduladores (azatioprina, metotrexato) y medicamentos biológicos basados en anticuerpos monoclonales anti-TNF- α . Los objetivos de estos tratamientos son inducir y mantener la remisión clínica, y conseguir una curación de la mucosa que permita restablecer la función intestinal normal. Aunque los fármacos empleados son eficaces en un grupo de pacientes, no están exentos de efectos adversos frecuentes y a veces graves. A pesar del empleo de fármacos, cada vez más generalizado, no se ha conseguido reducir la necesidad de tratamiento quirúrgico, que requieren un 40% a 50% de los pacientes a los 5 años del diagnóstico. Por otro lado, un 10% a 15% de los pacientes presentan actividad crónica a pesar de un tratamiento médico intensivo, y la localización o la extensión de su enfermedad hacen que la cirugía esté contraindicada. Este hecho obliga a buscar nuevas opciones terapéuticas para este grupo de pacientes.

La inducción de tolerancia es un proceso básico para la prevención de la autoinmunidad, y los linfocitos Treg ocupan un lugar fundamental en este proceso. Se ha demostrado que pueden prevenir e incluso curar varios modelos experimentales de colitis. Sin embargo, la aplicabilidad del tratamiento depende en gran medida del número de linfocitos Treg que puedan aislarse y transferirse. En este sentido, las células dendríticas son capaces de

inducir y activar linfocitos Treg que tienen un papel esencial en la supresión de la respuesta inmunitaria contra antígenos propios.²⁰ Resultados experimentales¹² en modelos murinos demuestran que la utilización de células dendríticas tolerogénicas incubadas en presencia de VIP previene o incluso revierte la inducción de colitis por ácido trinitrobenzeno-sulfónico (TNBS) en ratones. El efecto terapéutico se asociaba claramente a una inhibición de la respuesta inmunitaria de tipo Th1, sobre todo debido a la generación de Treg secretores de IL-10. Un aspecto importante del mismo estudio es la ruta de inoculación de las células. Los autores demuestran que la administración intraperitoneal de células dendríticas-VIP permite su migración hacia los ganglios mesentéricos, lugar clave en el control de la respuesta inflamatoria intestinal.¹²

Con estos antecedentes, la posibilidad de generar células dendríticas tolerogénicas para su aplicación en humanos constituiría una aproximación terapéutica nueva en la enfermedad de Crohn, y ofrecería un tratamiento a un grupo de enfermos con un curso grave de la enfermedad y sin otras opciones en la actualidad.

Conclusión

Las células dendríticas son las células del sistema inmunitario implicadas en la generación de inmunidad o tolerancia. Debido a sus propiedades funcionales para generar o modificar el curso de la respuesta inmunitaria, han sido aplicadas terapéuticamente en clínica. En el caso de la enfermedad inflamatoria intestinal, las herramientas para el tratamiento, incluyendo los agentes biológicos más recientes, han sido ineficaces o incapaces de mejorar el pronóstico a largo plazo en una cierta proporción de los pacientes afectados. Diferentes estrategias terapéuticas prometedoras, tales como el bloqueo de los linfocitos T efectores (con anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-CD4 o anti-CD25), la administración sistémica de rIL-10, el bloqueo de la diferenciación/activación de las células T

(anti-IL-6, anti-IFN- γ , anti-IL-12, anti-IL-23, anti CD80/86) o del reclutamiento celular (anti-ICAM1, anti- α 4-integrinas), así como la estimulación del sistema inmunitario innato (GM-CSF), se han demostrado ineficaces hasta la fecha. La necesidad de nuevos tratamientos para la enfermedad de Crohn u otras enfermedades inflamatorias crónicas de base inmunitaria abre el camino para el desarrollo de innovadoras aproximaciones. Aunque hasta la actualidad no se han realizado estudios clínicos encaminados a evaluar la seguridad y la eficacia de las células dendríticas tolerogénicas, los resultados obtenidos *in vitro* y en modelos animales nos impulsan a explorar esta novedosa vía terapéutica.

Bibliografía

- Schuler G. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Eur J Immunol.* 2010;40:2123-30.
- Figdor CG, de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Melief CJ. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med.* 2004;10:475-80.
- Palucka AK, Dhodapkar MV, Paczesny S, Burkholder S, Wittkowski KM, Steinman RM, et al. Single injection of CD34+ progenitor-derived dendritic cell vaccine can lead to induction of T-cell immunity in patients with stage IV melanoma. *J Immunother.* 2003;26:432-9.
- Jefford M, Schnurr M, Toy T, Masterman KA, Shin A, Beecroft T, et al. Functional comparison of DCs generated *in vivo* with Flt3 ligand or *in vitro* from blood monocytes: differential regulation of function by specific classes of physiologic stimuli. *Blood.* 2003;102:1753-63.
- Hochrein H, Shortman K, Vremec D, Scott B, Hertzog P, O'Keeffe M. Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. *J Immunol.* 2001;166:5448-55.
- Veny M, Esteller M, Ricart E, Piqué JM, Panés J, Salas A. Late Crohn's disease patients present an increase in peripheral Th17 cells and cytokine production compared with early patients. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010;31:561-72.
- Iliev ID, Mileti E, Matteoli G, Chieppa M, Rescigno M. Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory T-cell differentiation through dendritic cell conditioning. *Mucosal Immunol.* 2009;2:340-50.

8. Piemonti L, Monti P, Allavena P, Sironi M, Soldini L, Leone BE, et al. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol*. 1999;162:6473-81.
9. Penna G, Adorini L. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol*. 2000;164:2405-11.
10. Pothoven KL, Kheradmand T, Yang Q, Houlihan JL, Zhang H, Degutes M, et al. Rapamycin-conditioned donor dendritic cells differentiate CD4CD25Foxp3 T cells in vitro with TGF-beta1 for islet transplantation. *Am J Transplant*;10:1774-84.
11. Lagaraine C, Lemoine R, Baron C, Nivet H, Velge-Roussel F, Lebranchu Y. Induction of human CD4+ regulatory T cells by mycophenolic acid-treated dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2008;84:1057-64.
12. González-Rey E, Delgado M. Therapeutic treatment of experimental colitis with regulatory dendritic cells generated with vasoactive intestinal peptide. *Gastroenterology*. 2006;131:1799-811.
13. Allavena P, Piemonti L, Longoni D, Bernasconi S, Stoppacciaro A, Ruco L, et al. IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur J Immunol*. 1998;28:359-69.
14. De Vries IJ, Eggert AA, Scharenborg NM, Vissers JL, Lesterhuis WJ, Boerman OC, et al. Phenotypic and functional characterization of clinical grade dendritic cells. *J Immunother*. 2002;25:429-38.
15. Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med*. 2001;193:233-8.
16. Banchereau J, Pascual V. Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity*. 2006;25:383-92.
17. Lowes MA, Chamian F, Abello MV, Fuentes-Duculan J, Lin SL, Nussbaum R, et al. Increase in TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a). *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:19057-62.
18. Tarbell KV, Petit L, Zuo X, Toy P, Luo X, Mqadmi A, et al. Dendritic cell-expanded, islet-specific CD4+ CD25+ CD62L+ regulatory T cells restore normoglycemia in diabetic NOD mice. *J Exp Med*. 2007;204:191-201.
19. Stoop JN, Harry RA, von Delwig A, Isaacs JD, Robinson JH, Hilkens CM. Therapeutic effect of tolerogenic dendritic cells in established collagen-induced arthritis is associated with a reduction in Th17 responses. *Arthritis Rheum*. 2010;62:3656-65.
20. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:685-711.

DISCUSIÓN

R. VILELLA: El objetivo de la inmunoterapia oncológica es obtener un efecto específico, por lo que se añaden antígenos específicos a las células dendríticas tratadas con dexametasona. En el estudio que has presentado, desde un punto de vista teórico, la administración de células dendríticas tratadas con dexametasona y sin antígenos específicos en pacientes podría funcionar. Pero desde el punto de vista del conocimiento actual, la opinión es que este tipo de tratamiento no tendría por qué funcionar y no sería distinto a tratar a los pacientes con dexametasona, debido a que aún no se conoce el antígeno del patógeno

causante de la enfermedad. ¿Podrías clarificar este aspecto del tratamiento?

D. BENÍTEZ-RIBAS: Éste es el punto clave de la terapia, la especificidad de los antígenos. En los estudios en modelos animales no se ha usado un antígeno porque para la enfermedad de Crohn o colitis no hay un antígeno descrito, y parece ser que no existe. La causa de este tipo de enfermedades es la permeabilización del epitelio, por destrucción o por otros motivos, que provoca la entrada de bacterias en el organismo que estimulan al sistema inmunitario de manera crónica, y

como consecuencia se destruye el epitelio. Creemos que la razón de que el tratamiento funcione (tanto en modelos múridos como en pacientes) es que las células dendríticas, que se inyectan por vía intraperitoneal, migran a la zona inflamatoria e interaccionan con las bacterias o los antígenos causantes de la inflamación, producen IL-10 y en última instancia interaccionan con los linfocitos T. En la primera fase de este estudio, las células dendríticas se inyectan por vía intraperitoneal para evaluar su seguridad, pero en la segunda fase podrían administrarse en otras localizaciones, como por ejemplo en las lesiones o en los ganglios linfáticos, favoreciendo la interacción de las células dendríticas con los antígenos de la zona y la inducción de la respuesta inmunitaria. Aunque sí es verdad que la ausencia de un antígeno específico para la enfermedad es un problema para el estudio.

J. ARAMBURU: La clave para el tratamiento es la estabilidad del fenotipo. ¿Os habéis planteado un modelo múrido en el cual inducir enfermedad inflamatoria intestinal o enfermedad de Crohn para posteriormente inyectar las células dendríticas y ver si son tolerogénicas?

D. BENÍTEZ-RIBAS: El estudio no contempla ensayos para determinar la estabilidad de las células dendríticas, pero in vitro hemos visto que el fenotipo tolerogénico se mantiene durante 2 o 3 días. Son células terminales, por lo que no se dividen, y cuando ya han producido IL-10 e interaccionado con los linfocitos T se mueren. Lo que sí estamos desarrollando son modelos animales para estudiar la biodistribución de las células dendríticas cuando se inyectan. Gracias a los estudios realizados en el área oncológica, sabemos que el 95% de las células mueren en la zona de inoculación debido a la acción de los macrófagos, y que sólo un 4% a 5% de las células migran a los ganglios linfáticos drenantes.

M. DEL VAL: En pacientes tratados con este tipo de terapias, las células tolerogénicas y las cé-

lulas normales inmunogénicas (células maduras) se mezclan. ¿Habéis hecho estudios in vitro de dicha mezcla para ver qué ocurre?

D. BENÍTEZ-RIBAS: No hemos hecho este tipo de estudios con células maduras. Lo que sí hemos hecho es, en primer lugar, inducir células con un perfil de respuesta de tipo Th1 mediante toxina toxoide. Estas células son células in vitro polarizadas, productoras de IFN- γ , con repetidas expansiones con células dendríticas maduras. En segundo lugar, las hemos estimulado con células tolerogénicas. El resultado es que la producción de IFN- γ se anula. Pero podríamos hacer dicho estudio.

L. GRAÇA: Mi pregunta va encaminada a la distinción entre células tolerogénicas y células inmunosupresoras. Si las células tolerogénicas no tienen un antígeno específico, ¿la infusión de células dendríticas tolerogénicas podría tener impacto en la respuesta inmunitaria frente a otros agentes o infecciones?

D. BENÍTEZ-RIBAS: Sí hay un riesgo de generar tolerancia. Uno de los posibles riesgos de inyectar células dendríticas tolerogénicas en una zona con una alta presencia de bacterias y que posee una gran interacción con el medio exterior es que podemos favorecer infecciones. Este riesgo también existe en los tratamientos de tumores, en los que se puede generar autoinmunidad. Pero hay que sopesar los riesgos y los beneficios, y en este caso los beneficios son mayores.

A. CELADA: El eslabón perdido en terapia celular es la localización de estas células. Este problema ya lo hemos solucionado en nuestro grupo de investigación en el modelo de ratón. Realizamos un tratamiento in vitro a los macrófagos de ratón y, cuando los inyectamos, se dirigen específicamente al sitio inflamatorio. Creo que vosotros también deberías aplicar esta técnica, debido a que las células dendríticas se expanden por todo el organismo, por lo que su acción específica es muy pequeña. En cambio, si las células es-

tuvieran dirigidas específicamente a la zona inflamatoria, el tratamiento tendría un gran efecto.

D. BENÍTEZ-RIBAS: Estoy de acuerdo en que la localización es un problema porque necesitamos saber a dónde se dirigen las células. Para poder averiguarlo, la primera fase del estudio incluye la inyección intraperitoneal de células dendríticas en los pacientes, que creemos que migran a la zona afectada por

la inflamación del intestino o a sus ganglios mesentéricos. Además, también estamos caracterizando el receptor CCR9, que es un receptor de quimiocina que dirige específicamente los linfocitos T hacia la lámina propia. Por otro lado, en la segunda fase del estudio pretendemos averiguar hacia dónde migran las células dendríticas mediante el uso de partículas paramagnéticas y de técnicas de imagen por resonancia magnética, pero la agencia reguladora aún no lo ha aprobado.