



Programa de Biociencias Moleculares

**Análisis de la generación de anticuerpos
anti-HLA en la terapia con ASC alogénicas en la
Enfermedad de Crohn fistulizante**

TESIS DOCTORAL
Cristina Martín Martín

Madrid, 2018



Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

Análisis de la generación de anticuerpos anti-HLA en la terapia con ASC alogénicas en la Enfermedad de Crohn fistulizante

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Cristina Martín Martín

(Licenciada en Bioquímica por la Universidad de Salamanca)

Directora

Olga de la Rosa Morales

Departamento I+D TiGenix. Madrid /
Servicio de Inmunología, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, Madrid

***A mis hijos,
Manuel y Adrián***

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Olga de la Rosa Morales, por darme la oportunidad de llevar a cabo mi formación doctoral e incluirme en el proyecto llevado a cabo desde el departamento de I+D de TiGenix, así como su confianza e inestimable ayuda. De igual forma, a José Luis Castañer Alabau, adjunto de la sección de Histocompatibilidad, en el servicio de Inmunología del Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid). A ambos agradezco todo el apoyo y orientación durante este largo recorrido. No sois conscientes de todo lo que he aprendido de vosotros tanto profesional como personalmente, además de alguna que otra experiencia gastronómica. Os habéis convertido en la principal referencia para todos los proyectos que empiezo a partir de ahora.

Al Dr. Javier Coll, antiguo jefe de Servicio de Inmunología, por abrirme las puertas al inicio de mi residencia y enseñarme entre otras cosas, que un inmunólogo es alguien que ha perdido su camino, porque al final todo recorrido acaba en el linfocito y hay que ser creyente. Él ha sido el que más insistió en que este manuscrito se hiciera posible. De igual forma, agradecer a la Dra. Luisa M^a Villar Guimerans, actual jefa de Servicio de Inmunología, su apoyo, aliciente y referente investigadora, así como la accesibilidad a pesar de todas sus responsabilidades para aclarar mis dudas.

Al Dr. Wilfried Dalemans, jefe tecnológico de TiGenix NV, por haberme permitido utilizar los datos pertenecientes al ensayo clínico para dar forma a mi trabajo de tesis doctoral.

Al departamento de I+D de TiGenix (Madrid), Ramón, gracias por prepararme las células y tu ayuda en la puesta a punto del protocolo. Cristina, tu experiencia en citometría con las ASCs me facilitó mucho el trabajo. A Pablo, por las dudas con el papeleo doctoral y a Borja también, sois partícipes como los que más de este trabajo, sin vosotros el resto de monitorización inmunológica y bases de datos no habría sido posible. En especial, os agradezco vuestra acogida y buenos ratos.

A todos los pacientes y clínicos que han participado en el estudio. Sin ellos, no habría habido datos que contrastar.

También tengo que hacer una mención especial a Carlos, qué habría sido de nosotros sin tus idas y venidas con las muestras y reactivos, gracias por tu amabilidad infinita. Así como las recomendaciones brindadas por José Carlos, tanto durante mi residencia como en la última etapa del proyecto, gracias a ti entiendo un poco más el Luminex. Y por el Luminex también, me gustaría agradecer a mis compañeros Santi, Miguel Ángel e Israel, al igual que a María, técnico de HLA-biología molecular, su ayuda con la adquisición de muestras y alguna que otra conversación transcendental.

No puedo dejar de agradecer toda la formación prestada por mi tutor y principal adjunto de la residencia, Dr. Ernesto Roldán, los años y permanencia en este campo me han enseñado el gran profesional y persona que eres. Lo mismo para el resto de facultativos del Servicio, Garbiñe Roy, Ángela Carrasco, Mercedes Espiño, Ana de Andrés y Nora Clerici, formáis parte de mi historia como “Ramona”. Permittedme, hacer una valoración personal a la Dra. Lali Rodríguez, compañera de fatiga con los días de muestras infinitas y atascos de citometría, gracias por tus consejos y en especial, por esos momentos de desahogo de esa enfermedad que tú y yo sabemos.

A todos mis compañeros en este periodo de formación como especialista, Raquel y Gabi, mis “R” mayores, nadie mejor que vosotras para resolverme cualquier duda desde el primer hasta el última día. Inma, siempre recordaré nuestras tardes infinitas frente a las adquisiciones a pedales. Silvia, me enseñaste a leer placas pero sobre todo, envidio ese espíritu aventurero. Y como no mencionar a Carmen, derrochas simpatía y odio que me pegaras la manía de pasar datos con *reggaeton*. En cualquier caso, a día de hoy todas vosotras seguís siendo perfectas para ir de inmunocañas. Al igual que Dani, Paula, Amalia, Carlota, Poullette, Nacho...y al resto de inmunólogos madrileños con los que he compartido la experiencia.

Y aunque no inmunólogas, bueno, Reyes sí, debo agradecer a Alejandra, Alicia, Claudia y Elena, mis pardas favoritas, el verdadero inicio de esta etapa, mis colegas de biblioteca para sacarnos eso del BIR, ocho años después, se han convertido en mis colegas de aventuras, bodas y vigilantes de laboratorios a lo largo de todo el territorio nacional.

A Eva, Manu, Cris, Rober, Óscar y Melisa, componentes de la cuchipandi salmantina, representáis esos amigos que conforman la familia que uno puede elegir.

Y no por ser los últimos, son los menos importantes, mi familia de verdad, a mis padres, mi hermana Rosa, que incluso se atrevió a leer la introducción y resultados de este trabajo siendo de letras. Mis hermanos Lito y Silvia, gracias por hacerme tía, bueno, mi cuñada Nieves también es responsable, y permittedme estar tan orgullosa de mis sobrinos, Hugo, Pablo y María. A todos vosotros os debo lo que soy, por todos esos momentos en los que me habéis apoyado cuando os he necesitado, en especial a mi “chico” Lolo y mis hijos, Manuel y Adrián, vuestra sonrisa es la mayor motivación para enfrentarme a cada día.

A todos los que me he cruzado en esta andadura que es la vida, habéis dejado un pedacito de vosotros en mí.

RESUMEN

La administración de células madre mesenquimales (MSC) en el tratamiento de trastornos inflamatorios, isquémicos e inmunológicos representa una terapia prometedora. El uso de células mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASC), de mayor accesibilidad y rendimiento que otras fuentes, resulta una herramienta atractiva para favorecer entre otras, la formación de células T con un fenotipo regulador y/o el bloqueo de la maduración y función de las células dendríticas, lo que ha arrojado resultados beneficiosos en modelos animales y estudios preclínicos en humanos que confirman la eficacia y el papel inmunomodulador de las ASC. Estos hallazgos han estimulado el uso de terapias basadas en MSC alogénicas, a pesar del importante papel que juegan los antígenos leucocitarios humanos (HLA) en el rechazo de injertos, en donde la sensibilización HLA se ha señalado clásicamente como un factor de riesgo en el trasplante de órgano sólido (TOS), asociándose a peor pronóstico tanto a corto como a largo plazo. Sin embargo, en los desarrollos enfocados al estudio de la seguridad y eficacia terapéutica de las ASC, pocas veces se incluye un estudio que evalúe la respuesta alogénica en el receptor.

El objetivo general del proyecto es determinar la presencia, generación y efecto de los anticuerpos anti-HLA tras la administración local de ASC alogénicas controlado con placebo en 123 individuos con enfermedad de Crohn que presentan fístulas perianales complejas pertenecientes al ensayo clínico en fase III del producto Cx601 (NCT01541579). Se tomó como punto de partida el conocimiento, desarrollo y técnicas actuales en el campo del TOS y en todos ellos, se midió la presencia de anticuerpos anti-HLA antes y después del tratamiento a doble ciego. De forma complementaria, se demostró la capacidad de reconocimiento *in vitro* de las ASC por parte de los anticuerpos anti-HLA definidos y la capacidad lítica de los mismos. Además, los resultados se relacionaron con el tipaje HLA de cada paciente y se estudiaron las diferencias antigénicas con el HLA de las ASC utilizadas, tratamiento concomitante a la terapia celular y también con otros parámetros inmunes detectados a nivel sistémico. Como valor añadido al estudio de seguridad y eficacia, se ha determinado la progresión clínica de cada paciente incluido en el ensayo en relación a la presencia de estos anticuerpos, demostrando la eficacia del uso de ASC alogénicas a pesar de la generación de anticuerpos anti-HLA, hecho que es indicativo de una interacción entre el sistema inmune del paciente y el producto celular pero en base a nuestros resultados, no tiene relación directa con la evolución clínica, al menos, en aquellos pacientes sin sensibilización previa contra antígenos HLA. No obstante, el presente trabajo, da constancia de la generación de respuestas secundarias o de memoria en aquellos pacientes con presencia previa de anticuerpos (individuos presensibilizados) que dada la poca representación que han tenido en la cohorte, no permiten concluir de forma significativa la relación de eficacia con el producto celular, por lo tanto, futuros estudios serán necesarios para determinar con éxito el algoritmo a seguir en estos pacientes.

SUMMARY

Administration of mesenchymal stem cells (MSC) in the treatment of inflammatory, ischemic and immunological disorders represents a promising therapy. The use of mesenchymal cells derived from adipose tissue (ASC), with greater accessibility and performance than other sources, is an attractive tool to favor, among others, the formation of regulatory T cells and / or blocking of maturation and function of dendritic cells, which has shown beneficial results in animal models and preclinical studies in humans that confirm the efficacy and immunomodulatory role of ASC. These findings have stimulated the use of allogeneic MSC-based therapies, despite the important role played by human leukocyte antigens (HLA) in graft rejection, where HLA sensitization has been classically indicated as a risk factor in transplantation of solid organ (TOS), associating to worse prognosis in both short and long term. However, in the clinical trials focused on the study of the safety and therapeutic efficacy of ASC, a study to value the allogeneic response in the receptor is rarely included.

The general objective of the project is to determine the presence, generation and effect of anti-HLA antibodies after the local administration of allogeneic ASC controlled with placebo in 123 individuals with Crohn's disease who present complex perianal fistulas belonging to the phase III clinical trial of the product Cx601 (NCT01541579). The knowledge, development and current techniques in the field of TOS were taken as starting point and in all of them, the presence of anti-HLA antibodies was measured before and after the double-blind treatment. In a complementary manner, the ability of *in vitro* recognition of ASC by the defined anti-HLA antibodies and their lytic capacity was demonstrated. In addition, the results were related to the HLA typing of each patient and the antigenic differences with the HLA of the ASC used, concomitant treatment to the cell therapy and also with other immune parameters detected at the systemic level. As an added value to the study of safety and efficacy, the clinical progression of each patient included in the trial has been determined in relation to the presence of these antibodies, demonstrating the efficacy of the use of allogeneic ASCs despite the generation of anti-HLA antibodies, this is indicative of an interaction between the immune system of the patient and the cellular product but based on our results, has no direct relationship with clinical evolution, at least, in those patients without previous sensitization against HLA antigens. However, this work shows the generation of secondary or memory responses in those patients with pre-existing antibodies (presensitized individuals) that, given the poor representation they have had in the cohort, do not allow concluding the relationship between efficacy and the allogeneic product, therefore, future studies will be necessary to determine successfully the algorithm to follow in these patients.

INDICE

ABREVIATURAS.....17

1.-INTRODUCCIÓN.....21

1.1.-Bases inmunológicas del reconocimiento alogénico.....21

1.1.1.- Sistema HLA.....22

1.1.1.1.- Genes y estructura molecular.....22

1.1.1.2.- Genes y moléculas MICA.....26

1.1.2.-Mecanismos implicados en el reconocimiento alogénico.....28

1.1.2.1.-Repertorio T del receptor28

1.1.2.2.-Células presentadoras de antígeno en la sensibilización alogénica.....29

1.1.2.3.-Vías de reconocimiento alogénico.....30

1.1.2.4.-Respuesta de células B y anticuerpos anti-HLA.....32

1.2.-Terapia celular.....37

1.2.1.-Historia de la terapia celular.....37

1.2.2.-Características y aplicaciones de las MSC.....39

1.2.3.-MSC derivadas del tejido adiposo (ASC).....43

1.3.-Terapia celular alogénica.....45

1.3.1.-Características y diferencias con la terapia celular autóloga.....45

1.3.2.-ASC alogénicas como alternativa en la enfermedad de Crohn fistulizante....49

2.-OBJETIVOS.....54

2.1.-Objetivo general.....54

2.2.-Objetivos específicos.....54

3.-MATERIALES Y MÉTODOS.....56

3.1-Diseño del estudio.....56

3.1.1-Características generales del ensayo clínico.....56

3.1.2.-Obtención y conservación del material biológico.....57

3.1.2.1.-Aislamiento y cultivo de ASC.....57

3.1.2.2.-Plasma de los pacientes.....	58
3.1.2.3.-ADN de ASC y pacientes.....	58
3.2.-Metodología para la identificación de los anticuerpos anti-HLA.....	59
3.2.1.-Técnicas de fase sólida.....	59
3.2.2.-Elaboración de los patrones de respuesta.....	62
3.2.3.-Algoritmo <i>HLA-MatchMaker</i>	63
3.3.-Tipificación HLA del donante de ASC y pacientes.....	64
3.4.-Medida de la expresión de HLA-I y-II en la membrana de ASC.....	67
3.5.-Puesta a punto del FCXM con ASC.....	67
3.6.-Estadística.....	68
4.-RESULTADOS.....	70
4.1.-Análisis de anticuerpos anti-HLA.....	70
4.1.1.-Resultados a doble ciego.....	70
4.1.2.-Respuesta anti-HLA en individuos presensibilizados.....	75
4.1.3.-Anticuerpos anti-HLA al año de seguimiento.....	78
4.2.-Reconocimiento <i>in vitro</i> por los anticuerpos anti-HLA.....	82
4.2.1.-Expresión de HLA en la membrana de las ASC.....	82
4.2.2.- Detección de la fijación de anticuerpos anti-HLA sobre las ASC.....	84
4.2.3.-Reconocimiento de las ASC por los anticuerpos anti-HLA pre-existentes.....	83
4.3.-Relación de FCXM con el ensayo multiplex.....	87
4.4.-Capacidad citotóxica de los anticuerpos anti-HLA sobre las ASC.....	90
4.5.-Factores condicionantes de la generación de anticuerpos anti-HLA.....	91
4.5.1.-Diferencias antigénicas del tipaje HLA entre donante de ASC y paciente.....	91
4.5.2.-Tratamiento concomitante al inicio del ensayo.....	94
4.5.3.-Perfil inmunológico.....	95
4.5.3.1.-Perfil inmune al inicio de la terapia.....	95
4.5.3.2.-Cambios tras el tratamiento asociados a la generación de ADES.....	97
4.6.-Impacto de la presencia y generación de ADES en la eficacia clínica.....	101

4.6.1.-Efecto de los anticuerpos anti-HLA.....	101
4.6.2.-Efecto de los anticuerpos anti-MICA.....	104
5.-DISCUSIÓN.....	109
5.1.-Valoración de la determinación de los anticuerpos anti-HLA.....	110
5.2.-Respuesta anti-HLA obtenida con respecto a otras terapias alogénicas.....	113
5.3.-Papel de los ADES en la terapia alo-ASC.....	116
5.3.1.-La presencia de ADES induce respuestas secundarias frente a alo-ASC.....	116
5.3.2.-El título de ADES influye en el reconocimiento y citotoxicidad <i>in vitro</i>	117
5.4.-Estrategias para minimizar la inmunogenicidad de ASC.....	121
5.4.1.-Ajuste de la compatibilidad ASC/paciente.....	121
5.4.2.-Terapia ASC combinada con anti-TNF e inmunomoduladores.....	124
5.4.3.-Determinación de biomarcadores predictivos de respuesta anti-HLA.....	126
5.5.-Propuesta de monitorización inmunológica para futuras administraciones.....	127
6.-CONCLUSIONES.....	132
7.-BIBLIOGRAFÍA.....	135
ANEXOS.....	151
-Publicaciones durante la tesis	
-Aprobación de CX601 por la Agencia Europea del Medicamento	

ABREVIATURAS

ADES anticuerpos donante específicos

ADN ácido desoxirribonucleico

APC *(del inglés)* células presentadoras de antígeno

ASC Células estromales derivadas de tejido adiposo

AUC área bajo la curva

CFU-F unidades formadoras de colonias de fibroblastos

DC *(del inglés)* células dendríticas

DMEM *(del inglés)* Medio de Eagle modificado por Dulbecco

FCXM *(del inglés)* Prueba cruzada por citometría de flujo

FcTOX Citotoxicidad por complemento medida por citometría de flujo

GvHD *(del inglés)* enfermedad injerto contra huésped

hESC *(del inglés)* Células estromales de tejido embrionario humano

HLA *(del inglés)* Antígeno leucocitario humano

HSP *(del inglés)* proteínas de choque térmico

IDO indolamina-2,3-dioxigenasa

IFATS *(del inglés)* Federación internacional para la terapia y ciencia con células mesenquimales adiposas

IFN-g interferón-gamma

IGF-1 Factor de crecimiento similar a insulina

IMF Intensidad media de fluorescencia

iPSC *(del inglés)* células estromales pluripotentes inducidas

- ISCT** (*del inglés*) Sociedad Internacional de terapia celular
- IVIG** inmunoglobulinas policlonales administradas de forma intravenosa
- LIF** Factor de inhibición de leucemia
- LSA** Labscreen Single Antigen ©
- LSM** Labscreen Mixed ©
- M-CSF** Factor estimulante de colonias de estirpe monocítica
- MHC** (*del inglés*) Complejo mayor de Histocompatibilidad
- MICA** (*del inglés*) Cadena A de clase I relacionada con MHC
- MO** Médula ósea
- MSC** Células estromales mesenquimales
- NKG2D**(*del inglés*) molécula D del grupo 2 relacionada con células NK
- PBS** solución salina tamponada con fosfato
- PCR-SSO**(*del inglés*) Reacción en cadena de la polimerasa- específica de oligonucleótidos
- PCR-SSP**(*del inglés*) Reacción en cadena de la polimerasa-específica de la secuencia
- PDAI** (*del inglés*) índice de actividad perianal
- PE** Ficoeritrina
- PGE2** prostaglandina E2
- PRA** (*del inglés*) anticuerpos reactivos frente al panel
- RMA** Rechazo mediado por anticuerpos
- rpm** revoluciones por minuto
- SBF** suero bovino fetal

- SCF** Factor stem cell
- SDF-1** Factor 1 derivado del estroma
- TA** temperatura ambiente
- TCR** Receptor de las células T
- TGF- β** factor de crecimiento transformante-beta
- TNF α** factor de necrosis tumoral alpha
- TOS** Trasplante de órgano sólido
- VEGF** Factor de crecimiento vasculo endotelial

INTRODUCCIÓN

1.INTRODUCCIÓN

1.1.- BASES GENÉTICAS DEL RECONOCIMIENTO ALOGÉNICO.

Aunque existen referencias de ensayos con implantes de tejidos humanos para remplazar áreas lesionadas a lo largo de la historia, la idea de auto trasplantar un tejido desde el mismo organismo a partir de un área dadora aparece ya en los escritos del médico indio Susruta (siglo IV a. C.). El impulso del trasplante moderno tuvo lugar en la década de los años 40. En un intento por mejorar la supervivencia de los pacientes que sufrían extensas quemaduras en su cuerpo, algunos cirujanos realizaron implantes de piel procedentes de donantes humanos para cubrir las áreas lesionadas (Gibson y Medawar, 1943). Sin embargo, los intentos de reemplazar la piel quemada con piel de donantes no relacionados no conllevaron ningún éxito, ya que a los pocos días la piel se necrosaba y se desprendía. Este problema llevó a muchos investigadores a estudiar el trasplante en modelos animales. Los experimentos realizados establecieron que el fracaso del injerto se debía a una reacción inflamatoria que se denominó rechazo, y lo que es más importante, varias características indicaban que el rechazo era una forma de inmunidad específica.

Los diferentes resultados obtenidos de los injertos realizados entre animales singénicos (genéticamente idénticos), y entre animales alogénicos (genéticamente diferentes) establecieron que existía una base genética para el reconocimiento del trasplante como extraño (Lakkis y Lechler, 2013) . A los genes responsables de que se percibiera un trasplante de tejido como similar o extraño a los tejidos propios, se les denominó genes de histocompatibilidad, y las diferencias entre lo propio y lo extraño se atribuyeron al polimorfismo genético entre los distintos alelos de histocompatibilidad.

Estudios posteriores demostraron que aunque varios genes podrían contribuir al rechazo, una sola región genética era la responsable de la mayor parte del mismo. Esta región, en la cual se comprobó que comprendía varios genes pero con una fuerte asociación de ligamiento, se llamó Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC, '*Major Histocompatibility Complex*') (Dausset, 1958). Aunque el papel de las moléculas del MHC como origen del rechazo inmunitario del injerto suscitó un considerable interés, la función principal de los genes del MHC en las respuestas inmunitarias frente antígenos proteicos no fue aclarado hasta finales de la década de los 70, con la demostración de que los linfocitos T específicos para un antígeno no lo reconocían en su forma soluble o libre, si no que precisaban que pequeños fragmentos de este antígeno se presentasen unidos a los productos de los genes del MHC (fenómeno denominado reconocimiento restringido al MHC o restricción MHC) (Rogers y Lechler, 2001).

1.1.1- Sistema MHC (HLA en humanos)

Debido a su polimorfismo, su expresión ubicua y su capacidad de iniciar una respuesta de células T, el MHC (HLA en humanos, del inglés Human Leucocyte Antigen) constituye el principal grupo de antígenos alogénicos “diana” de la respuesta inmune adaptativa y alogénica del receptor (Janeway C.,2001). No obstante, el conocimiento del Complejo Principal de Histocompatibilidad sigue ampliándose desde que se describió por primera vez como responsable del rechazo agudo de trasplantes. Los hitos fundamentales que le han precedido establecen:

- ❖ La asociación de los genes de histocompatibilidad con antígenos de membrana de los leucocitos.
- ❖ La vinculación de estos genes y sus productos con los fenómenos de restricción de la respuesta inmune, y el lugar central que ocupa en el control de la misma.
- ❖ La demostración de que un número de enfermedades autoinmunes y de otras etiologías tienen una asociación genética con el sistema HLA.

El MHC es por tanto, un conjunto de genes que codifican proteínas de superficie involucradas en la respuesta inmune. En el humano recibe el nombre de sistema HLA y las proteínas que codifica se denominan “moléculas HLA” o “antígenos HLA”. Su función primordial es la presentación antigénica.

1.1.1.1- Genes y estructura molecular del sistema HLA

El sistema HLA se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 6 (entre los marcadores 6p21.31 y 6p21.32), en un segmento de unas 4000 Kb que corresponde únicamente al 1/1000 del genoma humano. Está constituido por más de 200 genes, 40 de los cuales codifican antígenos leucocitarios. Los genes HLA se dividen en tres grupos o regiones: clase I, clase II y clase III (figura I1).

La organización genómica de la clase I presenta una compleja amalgama entre genes con distinta repercusión funcional. Existen 8 genes que se expresan, es decir, sus secuencias codifican proteínas reconocibles en la célula, (HLA-A, B, C, E, F, G, MICA y MICB), 4 pseudogenes completos (HLA-H, J, K y L), 4 pseudogenes truncados (HLA-75, 16, 80 y 90), y 3 fragmentos génicos. Intercalados entre los *loci* MHC propiamente dichos, se encuentran *loci* de genes no relacionados y sin función inmunológica reconocida (cadena β de la tubulina, proteína de unión a GTP, factor de transcripción de unión a octámeros).

Los genes que se expresan codifican la cadena α pesada de la molécula de clase I, y se distribuyen en genes de clase Ia y Ib. Los genes clásicos (ó Ia) HLA-A, HLA-B y HLA-C codifican glicoproteínas de membrana que se expresan en la mayoría de células nucleadas del organismo. Los genes HLA de clase I “no clásicos” (ó Ib), engloban a los

antígenos HLA-E, HLA-F y HLA-G, que a diferencia de los genes “clásicos”, tienen un polimorfismo, distribución y expresión celular y tisular limitados (Moscoso,2007) (Curigliano, 2013) .

Los *loci* MICA y MICB ('MHC class I Chain-related' A y B) también localizados en esta región, se excluyen de la categoría Ib por considerarse más ancestrales que el resto (se describen en el apartado 1.1.1.2.)

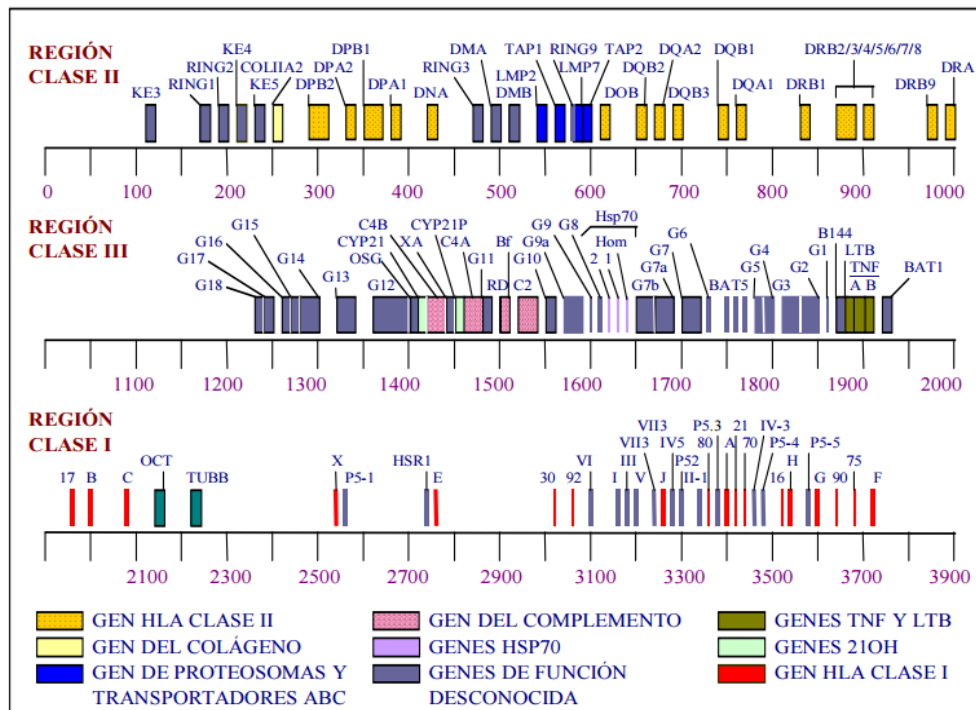


Figura I1. Mapa génico del complejo mayor de Histocompatibilidad en el cromosoma 6. (Adaptado de Cooke, 2001).

Los genes de clase II se agrupan bajo la denominación HLA-D y se distinguen 5 isotipos: DM, DO, DP, DQ y DR. Cada uno de estos, presenta dos tipos de *loci*, A y B, que codifican las cadenas α y β respectivamente de la molécula de HLA de clase II que se constituye como un heterodímero α/β . Los genes de los isotipos DR, DQ y DP codifican las moléculas de clase II principales, aunque se han identificado otros genes adicionales que codifican proteínas de clase II denominadas no clásicas.

La familia DR comprende un simple gen α (DRA) y más de 9 genes β (DRB1-9) incluidos pseudogenes (DRB2, DRB6, DRB7, DRB8, DRB9). En el caso de la familia DP, se expresa un gen para la cadena α (DPA1) y otro para la cadena β (DPB1); además existen dos pseudogenes (DPB2 y DPA2). Para la familia DQ, se expresa un gen para la cadena α (DQA1) y otro para la cadena β (DQB1), existiendo otros genes que no se expresan (DQB2, DQB3 y DQA2).

La región de clase II contiene otros genes que codifican proteínas involucradas en la presentación de antígeno (LMP2, LMP7, TAP-1, TAP-2), y que no son expresadas en la superficie celular. TAP-1 y 2 codifican las subunidades de una proteína heterodimérica que transporta péptidos del citosol al retículo endoplásmico, donde puede asociarse con cadenas pesadas de clase I recién traducidas. Los otros genes de este grupo, LMP2 y LMP7, codifican subunidades de un complejo de proteasas citoplasmáticas (proteasomas), que está implicado en la generación de péptidos a partir de proteínas citosólicas que se incorporan a las moléculas de clase I.

Avanzando hacia el centrómero, se encuentra la región de clase III que originariamente se creía circunscrita a los genes del complemento C4, C2 y Bf, e incluye también genes tan importantes como los del factor de necrosis tumoral (TNF), los de la enzima 21-hidroxilasa y los que codifican para tres miembros de la familia de las proteínas chaperonas (HSP).

El sistema HLA presenta una serie de características especiales como:

- *Polimorfismo alélico*: El polimorfismo del sistema HLA se debe a la existencia de un gran número de alelos para cada uno de sus genes. Esta diversidad genera una gran cantidad de combinaciones en un cromosoma, lo que hace extremadamente difícil hallar dos personas no emparentadas con HLA idéntico. En cada especie de mamífero los distintos loci del MHC poseen la mayor variabilidad genética intraespecífica. Este polimorfismo extremo ha permitido conocer al menos 490 alelos para el gen HLA-B, 250 para HLA-A, 119 para HLA-C y 315 para HLA-DRB1 (y cada año se siguen definiendo nuevos alelos). La mayor parte de la variabilidad se concentra en el exón 2 de los genes de clase II y en los exones 2 y 3 de los genes de clase I. Dentro de estos exones, la variabilidad está a su vez concentrada en determinadas posiciones, implicadas directa o indirectamente en la región de unión al péptido antigénico.

- *Haplotipo, segregación y codominancia*: Estudios familiares demuestran que la recombinación en esta región es rara, y el conjunto completo de alelos se heredan, habitualmente, como una unidad denominada haplotipo. Por cada progenitor existen dos haplotipos (uno por cromosoma). Un individuo hereda dos haplotipos de los cuatro posibles: 2 del padre (a y b) y 2 de la madre (c y d). De ello resultan 4 posibles combinaciones filiales: a/c, a/d, b/c y b/d, por lo que la probabilidad que dos hermanos sean HLA idénticos es del 25%, de que sean HLA diferentes del 25% y de que sean HLA semiidénticos o haploidénticos del 50%. El conjunto de los dos 2 haplotipos (uno heredado de cada progenitor) conforma el genotipo del individuo, éste se hereda en codominancia.

- *Desequilibrio de ligamiento*: Por otro lado, estudios de población han demostrado que ciertas combinaciones de alelos se heredan juntos más frecuentemente de lo esperado debido al azar. Este fenómeno se conoce como desequilibrio de ligamiento, varía con la población y con la etnia, y a veces incluso entre grupos de población de una misma etnia.

Las moléculas HLA I son glicoproteínas heterodiméricas presentes en todas las células somáticas nucleadas del organismo y también en plaquetas. Constan de una cadena pesada (subunidad alpha) de 45kDa codificada por genes HLA y una cadena ligera (subunidad beta) de 12kDa codificada por genes localizados en el cromosoma 15 que no pertenecen al sistema HLA (β 2 microglobulina). Un gen clásico de HLA de clase I o cadena α : consta de 8 exones que dan lugar a: el péptido señal, codificado por el primer exón, los exones 2, 3 y 4 que codifican los dominios extracelulares α 1, α 2 y α 3 respectivamente, el exón 5, que codifica la región transmembrana y los exones 6,7 y 8 que codifican la región citoplasmática (Figura I2). La región extracelular de la cadena pesada se pliega en tres dominios globulares: α 1, α 2 y α 3. Los dominios α 1 y α 2, que son altamente polimórficos, forman una estructura tridimensional denominada sitio de unión al péptido (peptide binding cleft). En las moléculas HLA de clase I esta estructura, análoga a una valva o hendidura, acomoda péptidos de entre 8-10 aminoácidos para su presentación a los linfocitos T y en el caso de las moléculas HLA de clase II acomoda entre 7-15 aminoácidos. La estructura macromolecular del sitio de unión al péptido se compone de un segmento inferior formado por una lámina plegada β que constituye la base y dos segmentos laterales formados por las α hélices de los dominios α 1 y α 2 a modo de “pared” de la valva. El dominio α 3, más conservado que los dominios α 1 y α 2, se pliega en forma de bucle para formar un dominio inmunoglobulina (Ig) que sirve como ligando de la molécula CD8 (Hansen, 2009).

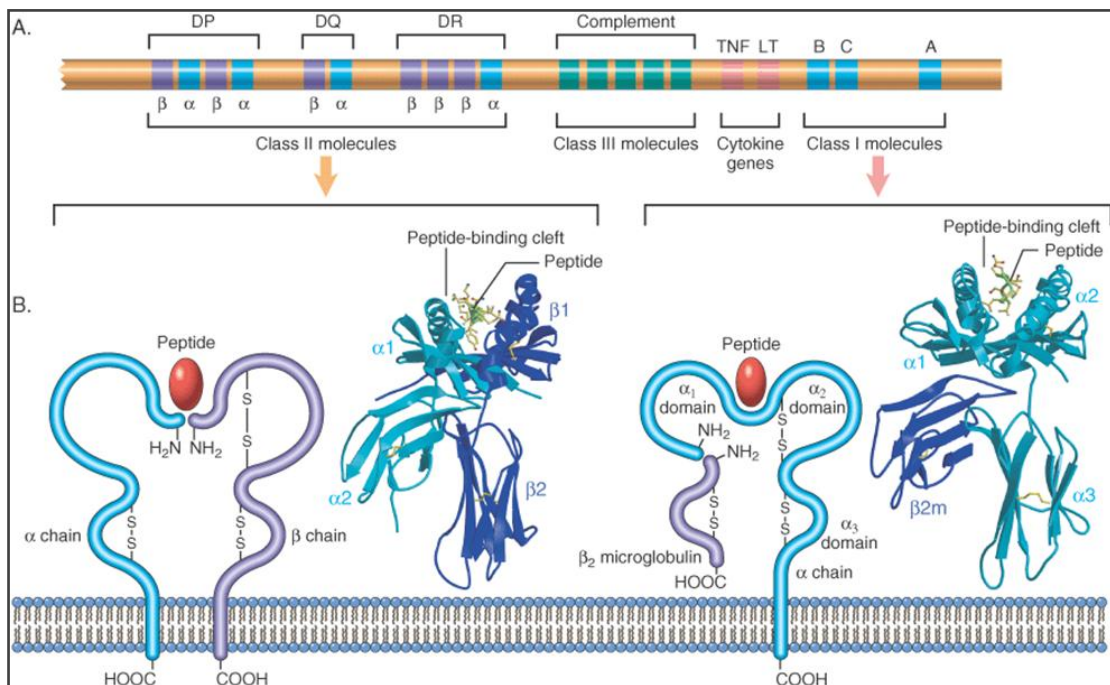


Figura I2. Genes y estructura de las moléculas HLA. Distribución de los genes del sistema de HLA (A). Estructura de las moléculas de HLA clase I y clase II y su conformación en membrana (B). Adaptado de Björkman, 1987

La $\beta 2$ microglobulina es una proteína no polimórfica que estabiliza la molécula HLA para que adopte la estructura terciaria adecuada. Esta molécula consta de unos 100 aminoácidos, con estructura de dominio de Ig. Está estabilizada por un puente disulfuro intracatenario, se asocia íntimamente al dominio $\alpha 3$ de la cadena pesada y no tiene fijación directa a la célula (Williams, 2002).

Las moléculas HLA II son glicoproteínas de membrana tipo I que constan de un heterodímero formado por una cadena α de 31-34kDa y una β de 26-29kDa (Figura 12). Ambas tienen una estructura similar; una porción extracelular con dos dominios ($\alpha 1$ y $\beta 1$, $\alpha 2$ y $\beta 2$) unida por una corta porción transmembrana a un dominio citoplásmico (carboxi-terminal).

El gen HLA II para la cadena α consta de 5 exones: el exón 1 codifica la secuencia líder, la secuencia señal y los primeros 5aa de la proteína. Los exones 2 y 3 codifican los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, el exón 4 codifica el péptido de conexión, la región transmembrana y citoplasmática, y el exón 5 codifica la región 3' no transcrita (UT). La estructura del gen de la cadena β es muy similar excepto el dominio citoplasmático que contiene 2 ó 3 exones codificantes.

El bolsillo de unión al péptido incluye los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$, forman una hendidura mayor que la de los antígenos de clase I para acomodar a los péptidos que van a ser presentados a los linfocitos T. Para ello, estos dominios se pliegan y forman una lámina de 8 bandas β plegadas antiparalelas (4 de α y 4 de β), que sirven de apoyo a dos hélices α (una de $\alpha 1$ y otra de $\beta 1$). Esta región de unión al péptido es polimórfica. Los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ son similares al dominio $\alpha 3$ de las moléculas de clase I y a la $\beta 2$ microglobulina, poseyendo por tanto características similares al dominio constante de las inmunoglobulinas. Los péptidos asociados a las moléculas de clase II son presentados a los linfocitos T CD4+. Bajo condiciones normales, sólo las células presentadoras de antígeno profesionales, es decir, células dendríticas, células del sistema macrófago-monocítico y linfocitos B, expresan en su membrana moléculas de MHC-II.

1.1.1.2.- Genes y moléculas MICA

Los genes *MIC* (Major Histocompatibility Class I chain related genes) son un grupo de genes polimórficos de la familia de moléculas MHC de clase I no clásicas que codifican proteínas de superficie inducidas por el estrés celular. La familia consta de dos genes funcionales, *MICA* y *MICB*, y cinco pseudogenes (*MICC-MICG*) (Choy y Phipps, 2010)

El gen *MICA* (figura 13), es el más polimórfico de la familia y está localizado en el brazo corto del cromosoma 6, en la región centromérica de MHC de clase I, a 46.5 kb del locus de HLA-B con el cual presenta desequilibrio de ligamiento.

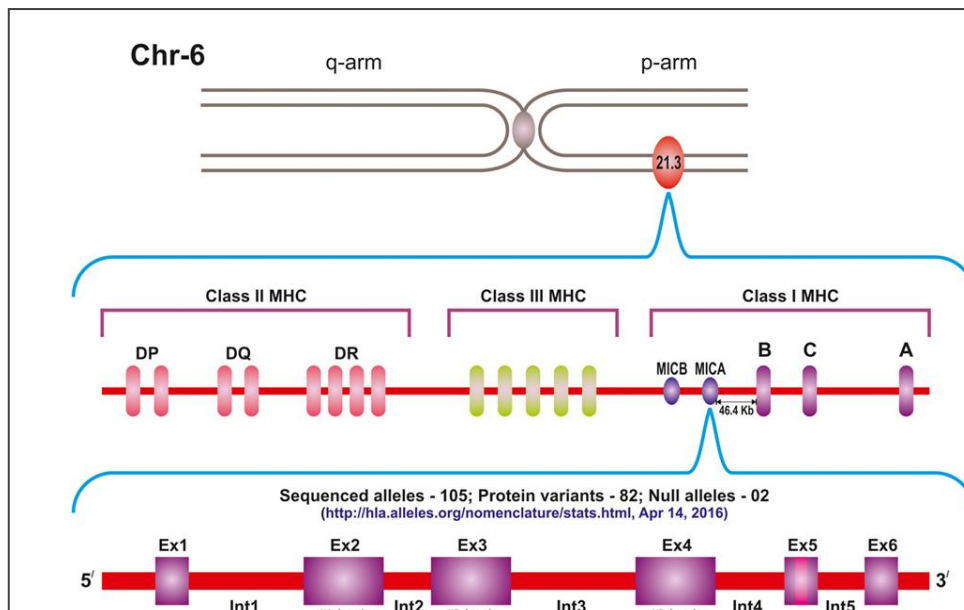


Figura 13: Localización y estructura del gen MICA (Baranwal y Mehra, 2017).

Las regiones del dominio extracelular de la molécula comparten entre el 15-36% de homología con el MHC clásico de clase I. El gen consta de 6 exones separados por 5 intrones que se transcriben en un RNAm de 1382pb que da lugar a un polipéptido de 383 aminoácidos y 43kDa. Al igual que las moléculas clásicas de clase I, la estructura de MICA consiste en tres dominios extracelulares, $\alpha 1$ (codificado por el exón 2) $\alpha 2$ (exón 3) $\alpha 3$ (exón 4), una región transmembrana (exón 5) y un tallo citoplasmático (exón 6) (Baranwal y Mehra, 2017). A pesar de sus similitudes estructurales con moléculas de clase I, MICA se diferencia en que no se une a la $\beta 2$ microglobulina, y que no depende de proteínas TAP (transport associated proteins), sugiriendo que su función es independiente de la unión a péptidos. La molécula MICA es un ligando para las células NK, linfocitos $T\gamma\delta$, y linfocitos $T\alpha\beta$ CD8+ que expresan el receptor activador NKG2D (natural killer group 2 member D) (Spies,2008). Este receptor es una lectina tipo C (transmembrana tipo II) que forma homodímeros unidos por puentes disulfuro en la superficie celular. Esta codificado por el gen KLRK1 (killer cell lectin-like receptor subfamily member 1) localizado en el cromosoma 12 humano. El receptor NKG2D reconoce varios ligandos que se expresan en situaciones de estrés celular o infecciones (ej.: MICA/MICB y también ULBPs) Similar a las moléculas de clase I clásicas, MICA exhibe un alto grado de polimorfismo. Existen varias posiciones polimórficas en los exones 2 a 4 del gen que codifican los dominios extracelulares de la molécula. Los más de 100 alelos descritos del gen (IMGT/HLA database; <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>) parecen dividirse en dos grupos parafiléticos, LI y LII, basados en el polimorfismo del exón 4 que codifica el dominio extracelular $\alpha 3$. En un estudio de 154 individuos españoles en la región de Murcia, se observó que más del 56% de los alelos MICA estudiados correspondían a MICA*008, MICA*004 y MICA*002 tradicionalmente asociados a población caucásica y a poblaciones del norte de África (Lucas, 2008). La diversidad alélica de MICA podría afectar la región de unión de MICA a

su ligando, desempeñando un papel en la posterior activación de células NK y la modulación de células T.

1.1.2.- Mecanismos implicados en el reconocimiento alogénico

La respuesta aloinmune dirigida frente a las diferencias antigénicas que el sistema inmune encuentra en el injerto se caracteriza por ser pleiotrópica, e incluye tanto la inmunidad específica (células T y B) como el reclutamiento de los mediadores celulares y humorales inflamatorios inespecíficos. La intensidad de la misma depende de múltiples variables: 1) respuesta del receptor (factores genéticos y adquiridos que controlan la respuesta inmune), 2) características del donante (tipo de injerto, presencia y tipos celulares), 3) la compatibilidad donante-receptor, y 4) el régimen de inmunosupresión.

1.1.2.1- Repertorio T del receptor

El reconocimiento por los receptores de las células T (TCR) de los alo péptidos presentados en el contexto de moléculas propias o alogénicas del MHC representa uno de los componentes clave en el inicio de la respuesta T al aloinjerto. El repertorio de las células T maduras se genera por un proceso complejo de reordenamientos génicos en los *loci TCRA* y *TCRB*, con la posterior asociación de las cadenas $TCR\alpha$ y $TCR\beta$ que pueden teóricamente generar una gran diversidad de especificidades (aproximadamente 10^{15} en el ser humano). Esta diversidad resulta en último extremo restringida a una representación mucho menor en la sangre periférica de los individuos adultos (aproximadamente 25×10^6) (Abbas, 2005). La mayor variabilidad de secuencia en las moléculas de TCR se concentra en las secuencias para la región CDR3 de cada familia $V\beta$ (región hipervariable), la compresión del repertorio real debe tener en cuenta la degeneración o flexibilidad de la especificidad del reconocimiento: el mismo heterodímero puede interactuar con diferentes péptidos presentados en una determinada molécula del MHC. Por otra parte, cambios discretos en la secuencia o en la polaridad del péptido reconocido pueden dar lugar a diferentes tipos de señalización en la célula T.

Otro de los aspectos esenciales en la formación del repertorio T es su educación durante su diferenciación en el timo. Las células del estroma tímico presentan en sus membranas un alto nivel de moléculas MHC de clase I y de clase II. Los timocitos inmaduros doble positivos (TCR+ CD3+CD4+CD8+) interactúan con estas células y sólo aquellos que reconocen el complejo MHC-péptido propio evitan una muerte celular por apoptosis a través de una selección positiva. Tras este reconocimiento los timocitos pasan a ser simples positivos (CD4+ ó CD8+). Aquellos que sobreviven a la selección positiva llevarán TCR de baja afinidad ó TCR de alta afinidad hacia auto-péptidos presentados por MHC propio. Aquellos que reconozcan MHC-péptido propio con alta afinidad serán eliminados

a través de una selección negativa, principal mecanismo implicado en el desarrollo de tolerancia central.

1.1.2.2.- Células presentadoras de antígeno en la sensibilización alogénica

Las células presentadoras de antígeno (APC, '*Antigen-Presenting Cells*') son un elemento crítico en el inicio de la respuesta inmune. Las APC profesionales derivan de progenitores hematopoyéticos; las que muestran una mayor eficacia en el procesamiento y presentación antigénica son el heterogéneo grupo de células dendríticas; en un segundo plano, pero con importantes funciones específicas, se encuentran los monocitos y las células B activadas.

Una característica importante en la inmunología del trasplante es que la activación de las células T del receptor se puede originar, potencialmente, tanto en las APC del donante como en las APC del receptor.

Los estudios en ratón demuestran que se producen cambios en la localización de ambos tipos de células, prácticamente de forma inmediata tras el trasplante: las APC del donante migran a los ganglios linfáticos y al bazo del receptor, mientras las APC del receptor migran al injerto y gradualmente reemplazan a las APC alogénicas (Krasinskas, 2000). El tiempo invertido en el reemplazo completo de las APC del injerto es variable; desde varias semanas para el injerto renal en cerdos hasta varios meses para el injerto de piel en ratones.

Los ganglios linfáticos que drenan la región del injerto son el sitio primario de sensibilización. Las células T vírgenes, que circulan por el circuito linfoide, son retenidas en los ganglios cuando encuentran el antígeno específico que promueve su activación. Sólo las células T activadas y las células de memoria son capaces de migrar a los tejidos extralinfoides, donde buscan el antígeno que provocó el estímulo.

Para que la respuesta adaptativa pueda mostrar todas sus características de especificidad, memoria, diversidad y discriminación entre lo propio y ajeno, los antígenos deben ser procesados y presentados a las células del sistema inmunitario. La diferencia de ser presentados en el contexto de clase I o clase II estriba en la procedencia del péptido. Los antígenos endógenos, derivados principalmente de proteínas virales o defectuosas son degradados por el complejo del proteasoma, translocados desde el citoplasma al Retículo endoplásmico (RE) por la proteína TAP (transportador asociado con la presentación de antígeno) y allí unidos a las moléculas HLA de clase I siguiendo la vía RE-aparato de Golgi hasta la membrana para ser reconocidos finalmente por los linfocitos T CD8+ (Abbas, 2005).

Los antígenos exógenos son, en condiciones fisiológicas, presentados en el contexto de las moléculas de MHC de clase II, derivados del procesamiento por la vía endocítica y son reconocidos por células T CD4+. Las respuestas frente a los aloantígenos deberían, según

este principio, estar limitadas a las células T CD4+. Sin embargo, los estudios sobre trasplantes indican que las células T CD8+ se sensibilizan también frente a antígenos exógenos presentados en el contexto de las moléculas singénicas de HLA de clase I. Este fenómeno sugiere que los antígenos exógenos pueden ser presentados por moléculas de clase I y se denomina fenómeno de sensibilización cruzada (*'cross-priming'*) (Cruz, 2017). Diferentes mecanismos parecen estar implicados en este tipo de sensibilización: 1) el contenido de los fagosomas de las APC puede trasvasarse al citosol para seguir la ruta de los antígenos endógenos; 2) los fagocitos pueden digerir el contenido lisosomal, de forma que los péptidos producidos pueden ocupar las moléculas de clase I; y 3) las células del donante que mueren liberan péptidos alogénicos que pueden ir asociados a proteínas de estrés (Hsp *'Heat shock proteins'*) y que son internalizadas por receptores específicos de las APC profesionales, pasan al citosol y se incluyen en la ruta de los exógenos.

1.1.2.3.- Vías de reconocimiento alogénico

Se han descrito tres tipos de reconocimiento alogénico: directo, indirecto y semidirecto. Ninguno de estos mecanismos de reconocimiento es mutuamente excluyente, aunque desencadenan eventos moleculares distintos, involucran APC de distinto origen (del donante o del receptor), reconocen moléculas MHC íntegras o procesadas (del receptor, del donante o de ambos) y finalmente pueden jugar un papel de mayor o menor relevancia en diferentes etapas del trasplante (Rogers y Lechler, 2001). El hecho central que distingue a la respuesta inmune alogénica frente a la mayoría de respuestas a antígenos extraños es el reconocimiento directo de los aloantígenos del donante: las células T del receptor a través del TCR interactúan directamente (sin restricción MHC) con las moléculas del alo-MHC sobre las células del donante (figura 14).

La respuesta alogénica directa se inicia cuando células T aloreactivas del receptor reconocen de forma íntegra (directamente, sin previo procesamiento del antígeno) el complejo péptido + molécula MHC del donante en APC del donante. Estas APC son "células pasajeras" del donante que permanecen en espacios intravasculares y extravasculares del aloinjerto tras el trasplante (Hornick, 2006) en el caso de injertos de órgano sólido. Pietra y colaboradores fueron los primeros en demostrar la implicación de la vía de reconocimiento alogénica directa en el rechazo en un modelo de trasplante cardíaco en ratones desnudos (SCID y Rag -/-). Demostraron que la transferencia de linfocitos CD4+ singénicos por sí solos podían causar rechazo agudo del aloinjerto, siempre y cuando se uniesen a moléculas MHC de clase II del donante (vía directa) (Pietra y col, 2000). No obstante en el trasplante de órgano sólido este proceso sólo ocurre en las primeras semanas post-trasplante, cuando aún hay células del donante. A largo plazo la respuesta alogénica directa parece perder relevancia.

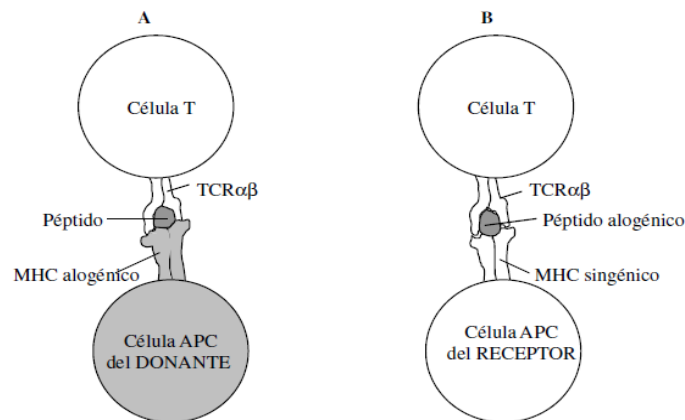


Figura I4: Mecanismos del reconocimiento alógeno: A) Reconocimiento directo, las células T del receptor reconocen los complejos de las moléculas del alo-MHC cargadas con péptidos procesados en la APC del donante, sobre la superficie de las APC del donante; B) Reconocimiento Indirecto, las células T del receptor reconocen a los aloantígenos, procesados por las APC del receptor y presentados en el contexto de las moléculas propias de MHC. (Las figuras sombreadas indican componentes del donante).

El Reconocimiento alógeno indirecto, es otra vía de activación T y se denomina así porque requiere un paso intermedio de procesamiento antigénico. Ocurre cuando células T aloreactivas del receptor reconocen péptidos procedentes de antígenos del donante procesados y presentados unidos a moléculas MHC propias por APC del receptor; es decir, péptido del donante unido a un complejo MHC-APC del receptor (Hornick, 2006). Éste sería el mecanismo habitual de restricción de células T por MHC propio. Los trasplantes de aloinjerto de piel en ratones realizados por Auchincloss y colaboradores fueron clave para demostrar el papel de la vía indirecta de aloreconocimiento en el rechazo. Los experimentos se realizaron en tres líneas de ratón (C57BL/6J, C3H.SW y BALB/cByJ) en las que se les deplecionó los linfocitos CD4+ ó CD8+ con el objetivo de que fueran dependientes de un tipo de linfocito o del otro. Estos ratones recibieron un aloinjerto de piel procedente de un ratón knockout” para MHC de clase II y que por lo tanto dependía de MHC de clase I para presentación antigénica. Cuando eliminaban los linfocitos CD8+ del receptor para hacerlo dependiente de los linfocitos CD4+ y éste recibía un aloinjerto de piel MHC II -/- , el sistema inmune del receptor (los CD4+) sólo podía reconocer péptidos del donante si estos estaban unidos a moléculas MHC de clase II. El sistema inmune de ratón era completamente dependiente de sus propias moléculas MHC de clase II para el procesamiento y presentación de antígenos procedentes del donante. De esta forma demostraron que la vía indirecta, que es el mecanismo habitual de presentación antigénica, jugaba un papel importante en el rechazo del órgano (Auchincloss y col., 1993). Además este tipo de respuesta indirecta sí que podría aparecer en un plazo más largo de tiempo que la directa.

Finalmente, se ha propuesto una tercera vía de reconocimiento allogénico denominada semi-directa por la cual células T aloreactivas del receptor pueden reconocer péptidos íntegros unidos a moléculas MHC del donante sobre una célula del receptor, la vía de aloreconocimiento semi-directa lograría combinar simultáneamente un reconocimiento allogénico directo en el que el complejo péptido + molécula MHC de un donante sería transferido de forma íntegra a la superficie de la APC del receptor.

El mecanismo radica en la habilidad de las células dendríticas (DC) en capturar antígeno de células necróticas o en proceso de apoptosis (Herrera, 2004), así como de células vivas (Harshyne, 2001) y presentarlo en su superficie de forma íntegra (sin procesar) para su posterior presentación a linfocitos T citotóxicos. Harshyne y colaboradores, describieron que las DC, tanto las de fenotipo inmaduro como las de fenotipo maduro, tienen la capacidad de capturar moléculas MHC, antígenos tumorales endógenos, así como proteínas citoplasmáticas o de membrana procedentes de varios tipos de célula (linfocitos T y B, otras células dendríticas y macrófagos) mediante contacto célula-célula, o bien por la captura de exosomas o antígenos solubles. Estudios posteriores, como los liderados por Herrera y colaboradores, demostraron que las DC también son capaces de capturar moléculas MHC allogénicas procedentes de células endoteliales inflamadas y que este complejo MHC una vez expuesto en la superficie de la DC era funcional y capaz de inducir una proliferación policlonal de linfocitos T. En humanos, este fenómeno de transferencia de moléculas intactas de HLA del donante a la superficie de células DC del receptor también se ha observado en estudios donde células DC eran capaces de adquirir moléculas HLA específicas de tumores melanocíticos y luego expresarlas de forma íntegra en su superficie (Russo, 2000).

1.1.2.4.- Respuesta de células B y anticuerpos anti-HLA

Tras la primera evidencia del efecto deletéreo sobre el injerto asociado a la presencia de anticuerpos frente al HLA del donante, estos anticuerpos siguen constituyendo un factor de riesgo significativo en el trasplante de órgano sólido (Terasaki, 2003), sobre todo en riñón, corazón y pulmón. Como se mencionó previamente, la diana principal del efecto deletéreo de estos anticuerpos son los antígenos del sistema HLA. Si bien los anticuerpos frente a antígenos de clase I están implicados en la fisiopatología asociada al rechazo humoral, no se ha aclarado todavía la significación de los anticuerpos frente a antígenos de clase II o frente a otros antígenos no HLA del donante. A nivel de las especificidades reconocidas, aparte de los antígenos específicos del donante, también se han mostrado significativas las reacciones cruzadas derivadas de los polimorfismos ampliamente compartidos entre los antígenos HLA. Persisten asimismo dudas sobre el o los isotipos de inmunoglobulina implicados en el rechazo, el lapso de tiempo entre la aparición de anticuerpos y la presentación clínica de rechazo o pérdida de función.

Los anticuerpos anti-HLA pueden ser inducidos por la exposición a antígenos HLA alogénicos procedentes de transfusiones sanguíneas, embarazos o trasplantes previos. Estos anticuerpos pueden ser de dos tipos: frente a antígenos de HLA de clase I (expresados en las células nucleadas y en las plaquetas) y frente a antígenos HLA de clase II (células B, macrófagos, células dendríticas, células endoteliales y células T activadas).

La generación de anticuerpos anti-HLA es una respuesta T-dependiente e implica una compleja cooperación celular entre células presentadoras (células dendríticas), células B y células T. Los estudios de producción de aloanticuerpos tras el rechazo del injerto de piel han mostrado que tanto la producción inicial de aloanticuerpos de tipo IgM, como el cambio de isotipo que se produce posteriormente, se desarrollan de forma T CD4+ dependiente (Loveland, 1984; Bradley, 1992). La respuesta celular T desencadena las señales secundarias necesarias para la maduración de células B a células plasmáticas secretoras de inmunoglobulinas. Estas células B han reconocido previamente al antígeno en su conformación nativa, endocitado y presentado en las moléculas de histocompatibilidad. Esta cooperación T-B requiere por tanto, del estímulo específico (el reconocimiento por el TCR del antígeno específico en el contexto de las moléculas de clase II, primera señal), las interacciones entre las moléculas coestimuladores CD28/B7 (segunda señal) y CD40L/CD40 (tercera señal) entre célula T y célula B, respectivamente (Abbas, 2005). La interacción CD40/CD40L y las citoquinas secretadas en el espacio de cooperación promueven la proliferación y diferenciación de las células B (figura 15) hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos y/o células de memoria.

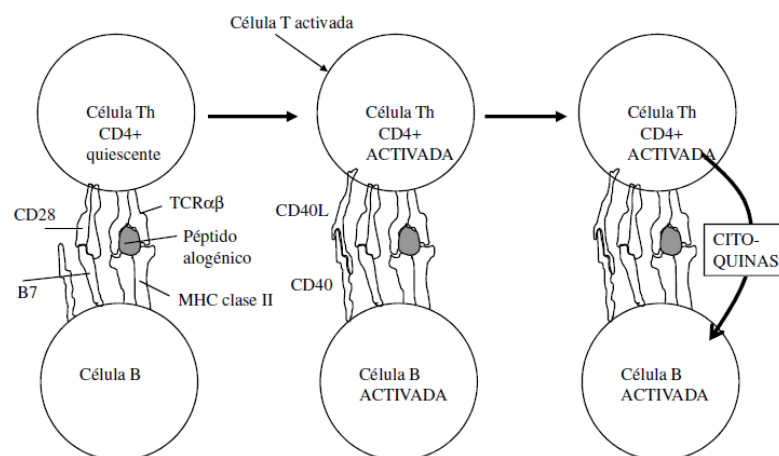


Figura 15: Cooperación T-B secuencial (primera, segunda y tercera señal) necesaria para la activación de las células B y diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos anti-HLA.

Se conocen dos tipos de respuesta inmune: la primaria y la secundaria.

Es la respuesta inmune que se produce ante el primer contacto con un determinado antígeno. Al cabo de varios días (entre 10-15 días) empiezan a aparecer anticuerpos cuya producción sigue un aumento exponencial hasta alcanzar una fase estacionaria en la que

empieza a declinar. Los anticuerpos que se forman en esta respuesta son mayoritariamente del tipo de las IgM, aunque algunas células B, tras la correcta cooperación T-B consiguen llevar a cabo de forma eficiente el cambio de isotipo y maduración de afinidad por recombinación somática, encontrando niveles detectables de IgG alrededor de los 21 días, cuando empiezan a sustituir a los anticuerpos de tipo IgM. En cualquier caso, al cabo de varias semanas, estas Inmunoglobulinas son casi imperceptibles.

Cuando el sistema inmunológico detecta por segunda vez la presencia del mismo antígeno, origina una respuesta bastante distinta de la anterior (figura I6): hay menos retraso entre la entrada del antígeno y la aparición de anticuerpos, que son en su mayoría del tipo IgG; siendo su producción mucho más rápida. Los valores de concentración de estas inmunoglobulinas en circulación son mayores y su persistencia muy superior (hasta varios años).

Las características de la respuesta inmune secundaria (respuesta más rápida, más intensa y de más larga duración) indican claramente que existe una memoria inmunológica. La base de esta memoria inmunológica reside en los linfocitos, algunos de los cuales, tras el primer contacto con el antígeno, se transforman en células de memoria (B ó T) de larga duración, sobreviviendo gran parte de la vida del animal. Los linfocitos de memoria están circulando continuamente a través del torrente circulatorio y órganos linfoides secundarios, de forma que rápidamente detectan una nueva entrada de antígeno y debido a la mayor avidéz de sus receptores de superficie por el antígeno, desencadenan una rápida producción de IgG.

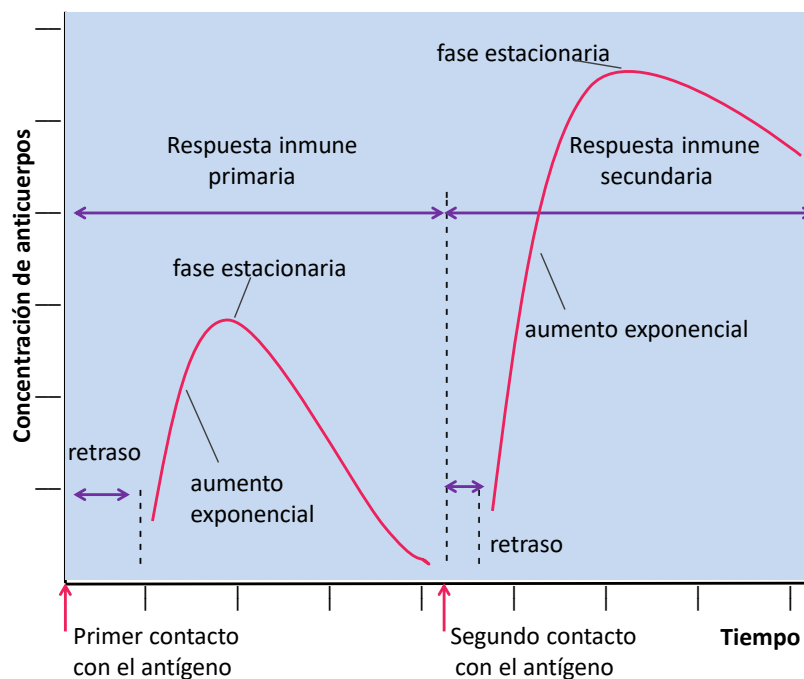


Figura I6: Cinética de la respuesta inmune primaria y secundaria

En el trasplante clínico se utiliza el término “sensibilizado” para referirse al individuo que presenta niveles detectables en suero de anticuerpos anti-HLA. Esta sensibilización implica a su vez una respuesta de las células T CD4+, que la precede en el tiempo e induce su desarrollo. Una vez iniciada la respuesta humoral, se presenta de forma relativamente autónoma y plantea intervenciones terapéuticas diferentes con respecto a las enfocadas hacia la respuesta celular. Para la mediación en el rechazo humoral, los aloantígenos deben ser expresados por el aloinjerto en niveles significativos (de forma espontánea o inducidos por citoquinas como el IFN- γ) y ha de existir una incompatibilidad entre donante y receptor.

El rechazo en el trasplante de órgano sólido (TOS) se ha clasificado tradicionalmente según sus características histopatológicas o el tiempo transcurrido desde el trasplante, más que por los mecanismos inmunitarios efectores; La presencia de anticuerpos en suero previo al trasplante puede provocar el rechazo hiperagudo del injerto, situación que conlleva el riesgo no sólo de la pérdida del injerto sino también la supervivencia del receptor. Se produce a los pocos minutos o primeras horas en el caso del trasplante renal. Se debe a la existencia de anticuerpos tanto frente a los antígenos del sistema ABO (Terasaki, 1959, Pikul , 1987) cómo HLA específicos del donante que activan el sistema del complemento y desencadenan una trombosis intravascular rápida con necrosis de la pared vascular. El rechazo agudo mediado por anticuerpos (RMA) se produce en las primeras semanas tras el trasplante, solapándose, en el caso de TOS con los cambios producidos por el daño de isquemia-reperfusión en el órgano y el rechazo celular agudo (mediado por células T CD8+), lo que hace que su diagnóstico no pueda realizarse basándose exclusivamente en ellos. El papel de los anticuerpos anti-HLA donante específicos (preformados o de novo) ha sido un tema clásico de discusión, desde su reconocimiento como el principal factor de riesgo en el rechazo del injerto (Terasaki, 1970). La prueba de microlinfocitotoxicidad o CDC (citotoxicidad dependiente de complemento) desarrollada en 1964 por el Dr. Paul Terasaki, resultó el primer método para comprobar la compatibilidad entre donante y receptor. Los linfocitos viables (T-B) de la persona en estudio son expuestos al suero del receptor. Posteriormente se agrega suero de conejo como fuente de complemento que es capaz de provocar daño de la membrana celular de los linfocitos que hayan unido anticuerpos, y por un marcador cromógeno vital, se identifican en microscopía. Los resultados se expresan en magnitud de reacción (1 = negativo, 2,4 = débilmente positivo y 6,8 = fuertemente positivo) dependiendo del porcentaje de lisis celular, ante un resultado positivo (mayoría de reacciones de 6 u 8) está más que justificado desaconsejar el trasplante (Duquesnoy, 2000) con lo que se consigue evitar el rechazo hiperagudo. Para evitar resultados contradictorios en base a la subjetividad de la técnica o bajos títulos, en los años 80 se desarrolló la prueba cruzada por citometría de flujo (Garavoy, 1983) de mucha mayor sensibilidad para evidenciar la unión anticuerpo-antígeno. En cualquier

caso el CDC sirvió por más de 30 años a los laboratorios de histocompatibilidad y logró estandarizarse a todo el mundo.

Aún con las medidas preventivas y el potencial terapéutico actual, el riesgo que representa la sensibilización antigénica se evidencia tanto en la aparición de episodios de rechazo agudo como en la pérdida crónica del injerto (Crespo, 2001). Los pacientes en lista de espera de trasplante renal deben ser objeto de un estudio periódico para detectar la existencia y, en su caso, los tipos y la evolución de los títulos de anticuerpos anti-HLA, lo que resulta imprescindible para un correcto manejo de estos pacientes a la hora de realizar el trasplante. La detección y caracterización de anticuerpos aumenta las posibilidades de éxito del trasplante, pero a la vez, cuantos más anticuerpos detectemos, más se reducen las posibilidades de encontrar un donante compatible. Por tanto, nos movemos en un estrecho equilibrio entre la sensibilidad (que permite detectar el máximo número de anticuerpos en el receptor, y mejorar la supervivencia del injerto) y la especificidad (que permite caracterizar aquellos anticuerpos con verdadera relevancia clínica). En los años 90 la detección de anticuerpos anti-HLA experimentó una gran evolución tras la implantación de la tecnología XMAP de Luminex y el desarrollo de moléculas HLA recombinantes sobre esferas sólidas. El estudio de DSA se centra principalmente en los anticuerpos de tipo IgG dirigidos frente a las moléculas de clase I y II del sistema HLA (Halloran, 1990; Halloran, 1992. Permite conocer de forma muy detallada cuales son las especificidades antigénicas contra las que reacciona el receptor (antígenos prohibidos) y cuales contra las que no reacciona (antígenos permitidos) (Muro, 2006). Teniendo en cuenta los locus HLA A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA1, DQB1, DPBA1 y DPB1. Algunos de estos no podían ser identificados mediante las pruebas de linfocitotoxicidad, de esta forma el Luminex ha puesto de manifiesto el rol de los anticuerpos contra epítomos específicos como HLA-C, HLA-DQA, HLA-DPA/B en el rechazo contra el injerto (Bachelet, 2016). La gran cantidad de información que aporta, que resulta en la detección de numerosos anticuerpos, puede complicar la selección de donantes. Para solventar esta situación se han desarrollado programas informáticos (como HLA Matchmaker, Duquesnoy; 2002) basados en el análisis de los epítomos característicos de cada molécula de HLA y aquellos que serían reconocidos por los anticuerpos detectados. Así, podemos precisar el grado de compatibilidad que existe entre los epítomos del donante, los del receptor y las especificidades de los anticuerpos encontrados.). La presencia de anticuerpos dirigidos frente a antígenos endoteliales o a los antígenos HLA de clase Ib (MICA), si bien pueden ser causa de depósito de C4d en ausencia de anticuerpos anti-HLA, aún no ha sido definido su papel fundamental en el rechazo del injerto. Asimismo, se desconoce la relevancia clínica de los anticuerpos de tipo IgM dirigidos frente a HLA (Gebel, 2003).

Otra de las desventajas del sistema Luminex, es que no existe un criterio común entre los diferentes laboratorios para definir qué nivel de anticuerpos (IMF) es relevante y cual no lo es, de forma que cada laboratorio tiene que establecer su punto de corte de IMF. En

la literatura encontramos un abanico de puntos de corte por encima del cual se interpreta un anticuerpo como representativo o inaceptable que puede oscilar entre 500 (Aubert, 2009), 1000 (Cail, 2013) y 3000 de IMF (Lobashevsky,2013). A pesar de ello, el Luminex se ha convertido hoy en día en el estándar en la mayoría de los laboratorios de histocompatibilidad.

1.2.- TERAPIA CELULAR

1.2.1.- Historia de la Terapia Celular

La terapia celular es una rama de la medicina regenerativa, según la ASGCT (American Society of Gene & Cell Therapy) se puede definir como el proceso de introducir células vivas y completas a un paciente para el tratamiento de una enfermedad hereditaria o adquirida.

El mantenimiento de la integridad de tejidos y órganos se produce de forma habitual durante gran parte de la vida, en individuos sanos. Este proceso requiere un equilibrio permanente entre las lesiones y la reparación del tejido, que se mantiene gracias a una delicada interacción entre mecanismos inflamatorios y células endógenas. Cuando existe un fallo en la capacidad de reparación endógena, la terapia celular constituye un enfoque terapéutico novedoso, diseñado para resolver este problema.

La utilización de células para tratar enfermedades no es un concepto nuevo. Desde tiempos ancestrales, se han ido utilizando tejidos de origen animal para curar enfermedades humanas, ejemplos de ellos se recogen en el antiquísimo tratado médico egipcio: el papiro de Ebers. El primer trasplante de célula registrado por la medicina moderna fue una transfusión sanguínea que data de 1667, de oveja a humano, llevada a cabo por Jean-Baptiste Denys. El término actual de terapia celular debe su legitimidad científica a las investigaciones sobre el trasplante de médula ósea. Los primeros indicios de la efectividad de estos procedimientos, derivaron de la observación de ratones irradiados que morían por insuficiencia hematopoyética y sólo se recuperaban cuando recibían inyecciones de una suspensión celular de un órgano como la médula ósea. Pasados los años 50, E. Donnall Thomas realizó el primer trasplante de médula ósea en humanos con éxito, llevado a cabo entre gemelos univitelinos (Santos, 1983). Fue en 1958 tras la identificación por Jean Dausset del primer agente de histocompatibilidad, el MHC o complejo mayor de histocompatibilidad (también conocido como antígeno leucocitario humano, HLA) cuando los trasplantes de células manifestaron un notable progreso. Al entender la relación entre la muerte del paciente y la compatibilidad entre el donante y el receptor, en 1973, se concluyó exitosamente el primer trasplante de médula ósea entre personas no emparentadas.

En 1988 se emplearon por primera vez células provenientes de cordón umbilical, para tratar a un niño de 6 años con anemia de Fanconi y ya en 1997 se emplearon previamente expandidas *ex vivo*. Tras estos grandes avances sobrevino la primera línea de células embrionarias creada por Jean Thompson en 1998 a partir de la masa celular interna de un embrión. El gran descubrimiento abrió fronteras, puesto que se trataba de células pluripotenciales que con los estímulos adecuados daban lugar a diferentes tipos celulares. El último gran hito científico en el campo de la terapia celular es el de generar células madre pluripotentes inducidas a partir de células adultas, desarrollado en 2006 por el equipo de Shinya Yamanaka, que logró con fibroblastos de ratón, y en el 2007 junto a James Thompson con células humanas. Este nuevo tipo celular presenta una versatilidad equivalente a las células embrionarias, superando además inconvenientes éticos y problemas de rechazo inmunológico.

En las últimas décadas se han desarrollado cada uno de estos avances científicos en multitud de ensayos clínicos que han culminado con éxito para abordar y tratar multitud de enfermedades degenerativas y autoinmunes.

Las principales características que requieren las células empleadas en terapia celular es que estén dotadas simultáneamente de la capacidad de autorrenovación (es decir, producir más células madre) y de originar células hijas comprometidas en determinadas rutas de desarrollo, que se convertirán finalmente por diferenciación en tipos celulares especializados. El retrato robot de una buena célula madre para terapias celulares y trasplantes en humanos sería ser efectivamente pluripotente, inmortal, es decir, tener la capacidad de autorrenovarse indefinidamente. Poseer un fenotipo estable, bien caracterizado desde el punto de vista molecular, carecer de potencial tumorigénico y ser susceptible de manipulación, para permitir modificaciones precisas, que permitan potenciar sus efectos terapéuticos.

En cuanto a su capacidad de diferenciación se conocen 3 tipos principales bajo investigación: Las células madre embrionarias, las células pluripotentes inducidas y las células madre adultas (figura 17).

- Células madre embrionarias humanas (hESCs “human Embryonic Stem cells” por sus siglas en inglés): El cigoto es una célula totipotente, tras sus primeras divisiones hacia mórula comienza una primera especialización hacia blastocisto que dará origen al trofoblasto (del que deriva la placenta) y a la masa celular interna (que dará origen al embrión), estas células son pluripotentes, es decir capaz de diferenciarse a cualquier tipo de célula adulta del cuerpo humano. Las hESCs se derivan a partir de embriones tempranos (en estado de blastocisto) *in vitro*, normalmente, procedentes de tratamientos de fertilización *in vitro* (FIV) (Dvash, 2006). El mayor problema que presentan es el dilema ético y moral que su uso implica, de gran controversia social que se agrava con la diferente legislación existente entre países.

- Células madre pluripotentes inducidas (iPSCs, por sus siglas en inglés: "induced Pluripotent Stem cells"): son un tipo de células madre con características pluripotenciales, capaces de diferenciarse en células de tejidos pertenecientes a las tres capas germinales y derivadas artificialmente de una célula que inicialmente no era pluripotencial (Avior, 2016). Por lo general se utiliza una célula somática adulta, es decir, ya diferenciada, sobre la que se induce la expresión de varios genes, tales como Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4, capaces de des-diferenciarla, lo que se denomina reprogramación.
- Células madre (estromales mesenquimales) adultas: En humanos se conoce desde hace años, la célula madre hematopoyética de adultos, que reside en la médula ósea y que da origen a todas las células de la línea roja de la sangre y del sistema inmune. Hoy en día se acepta la existencia de células madre adultas en casi todos o todos los órganos de los individuos adultos. Son células multipotentes, es decir, su capacidad de diferenciación está más limitada que las hESCs o las iPSCs, pero su uso está ampliamente aceptado. La función de estas células parece estar relacionada con la renovación de las células que mueren en los tejidos adultos (Verfaillie, 2002), así como con la reparación de pequeñas lesiones que se producen en los mismos.

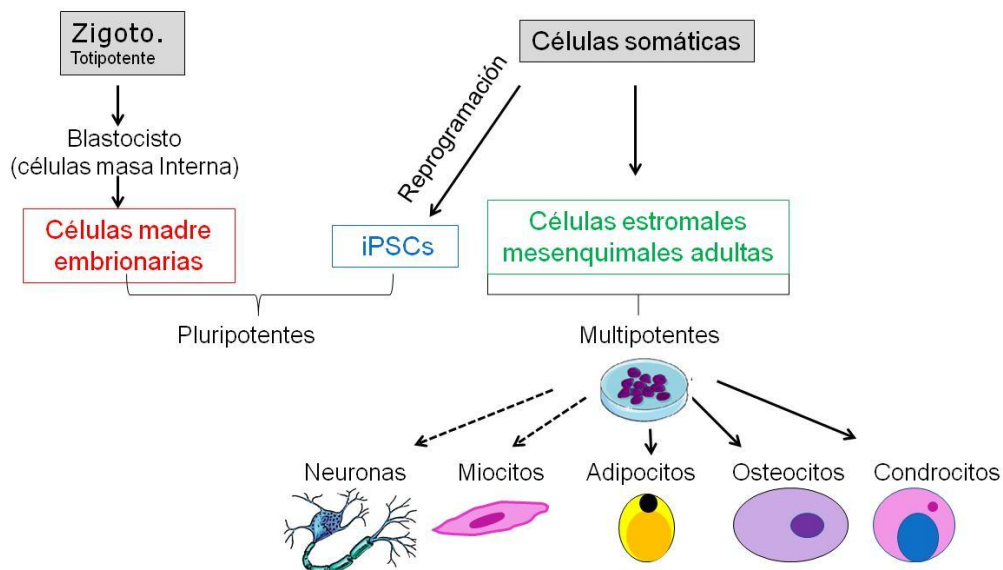


Figura 17: Tipos celulares empleados en terapia celular. (Adaptado de Power C., 2011)

1.2.2.- Características y aplicaciones de las Células Estromales Mesenquimales (MSC)

Las células estromales mesenquimales son células madre adultas y han suscitado un interés considerable en los últimos años debido a su capacidad de migrar a sitios de lesión tisular, su potencial de diferenciación multi-linaje, sus propiedades inmunomoduladoras y la facilidad de aislamiento y expansión *ex vivo* (Götherström, 2007)

Las células madre mesenquimales o células estromales mesenquimales (MSC), fueron identificadas por primera vez en la médula ósea (MO) por Friedenstein y colaboradores en 1976 y las describieron como una población adherente, de aspecto fibroblastoide, con capacidad de generar unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F) (Friedenstein, 1982). Tradicionalmente se las ha descrito formando parte del estroma de la médula ósea, donde representan el 0,01-0,001% de la celularidad total.

Desde su identificación, las MSC han sido clasificadas como una población heterogénea de células madre multipotentes, capaces de diferenciarse *in vitro* hacia una variedad de tejidos de origen mesodérmico, incluyendo el tejido óseo, tejido adiposo y tejido cartilaginoso (Young 1998) (Ferrari, 1998), así como hacia linajes de origen no mesodérmico, como células del sistema nervioso (Woodbury, 2000), miocitos (Rangappa, 2003) o hepatocitos (Hong, 2005).

Además de la médula ósea, las MSC también han sido aisladas de otros tejidos (figura 18), incluyendo tejido adiposo (Zuk, 2001), placenta (Miao, 2006), y tejidos fetales como, hígado, bazo y cordón umbilical (in 't Anker, 2003).

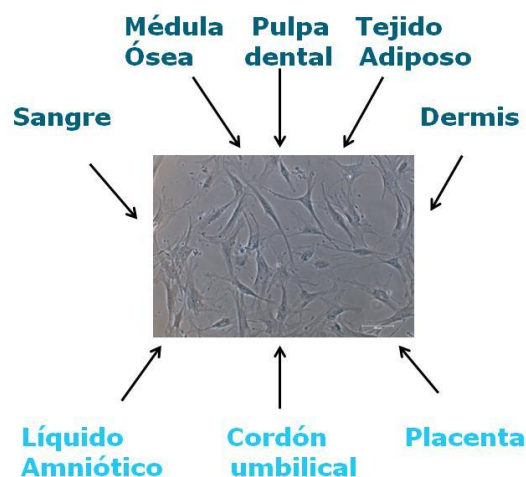


Figura 18: fuentes de origen de células estromales mesenquimales en tejidos embrionarios y adultos. Se muestra una imagen de microscopía de la morfología de MSC cultivadas “*in vitro*”.

Debido a la morfología fusiforme de las células mesenquimales así como a la ausencia de marcadores de membrana específicos, la comunidad científica (International Society for Cell Therapy, ISCT) ha decidido que para que una célula mesenquimal sea considerada progenitora debe cumplir tres requisitos bien definidos (Dominicci, 2006) (tabla 1). El primero y más esencial es la capacidad de adherirse a superficies plásticas, y además con capacidad de autorrenovación, es decir, cuando una célula progenitora mesenquimal se divide, al menos una de las células resultantes debe ser idéntica a la célula de la que procede, si bien en algunos casos ambas células hijas son idénticas a la célula de origen. El segundo de ellos, la existencia de un perfil fenotípico característico en un grupo de marcadores de membrana: entre los que deben tener un marcaje positivo están CD9,

CD29, CD44, CD51, CD59, CD90, CD73, CD105, HLA-I, y marcaje negativo para: CD34, CD133, HLA-DR. Por último, el tercero de ellos es la capacidad de diferenciarse a células de diferentes estirpes mesoteliales (hueso, condrocito, adipocito).

CRITERIOS ESTABLECIDOS PARA IDENTIFICAR MSC	
➤	Adherencia a superficies plásticas en condiciones de cultivo estándar.
➤	Fenotipo: Positivo (Mayor del 95%): CD73, CD90, CD105 Negativo (Menor del 95%): CD45, CD34, HLA-DR, CD14 ó CD11b, CD79a ó CD19.
➤	Diferenciación <i>in vitro</i> : Osteoblastos, condroblastos o adipocitos (demostrado con tinción del cultivo celular)

Tabla I1: Criterios imprescindibles para la caracterización de células mesenquimales estromales, según la Sociedad Internacional de terapia celular. (Adaptado de Dominicci, 2006)

Debido a la amplia distribución y plasticidad de las células mesenquimales, en el individuo adulto, numerosos grupos de investigación se han planteado utilizarlas como vehículo para Terapia Génica donde se han conseguido importantes avances terapéuticos en diferentes patologías mediante ensayos clínicos para la osteogénesis imperfecta, leucodistrofia metacromática y síndrome de Hurler (Koc, 2002). Pero su potencial regenerativo e inmunomodulador las posiciona como líderes en Terapia Celular. Se han llevado a cabo estudios preclínicos en roedores, conejos y monos babuinos, entre otros, para el trasplante de médula ósea, piel, corazón y córnea, enfermedad de injerto contra huésped, insuficiencia hepática y renal, lesión pulmonar, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes y enfermedades lúpicas (de Miguel, 2012). Los resultados preliminares de algunos de estos estudios han dado lugar a ensayos clínicos en humanos que se están llevando a cabo actualmente. En definitiva su uso se ha incrementado de forma exponencial; actualmente la página del Clinical Trials.gov (figura I9) recoge más de 2400 ensayos clínicos a nivel mundial con la entrada MSC (enero 2017).

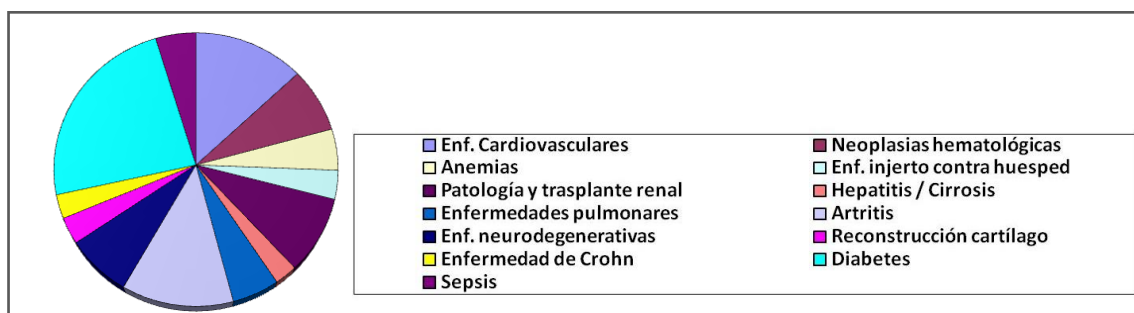


Figura I9: Distribución de los ensayos clínicos en desarrollo inscritos en el clinical trials.gov que utilizan MSC (enero 2017).

Las MSCs se utilizan en medicina regenerativa principalmente por su capacidad para diferenciarse a tipos de células específicas pero también como biorreactores de factores solubles que promoverán la regeneración de tejidos dañados. Además de estas propiedades regenerativas, las MSC poseen una capacidad inmunorreguladora sobre más de una variedad de células del sistema inmune (figura I10).

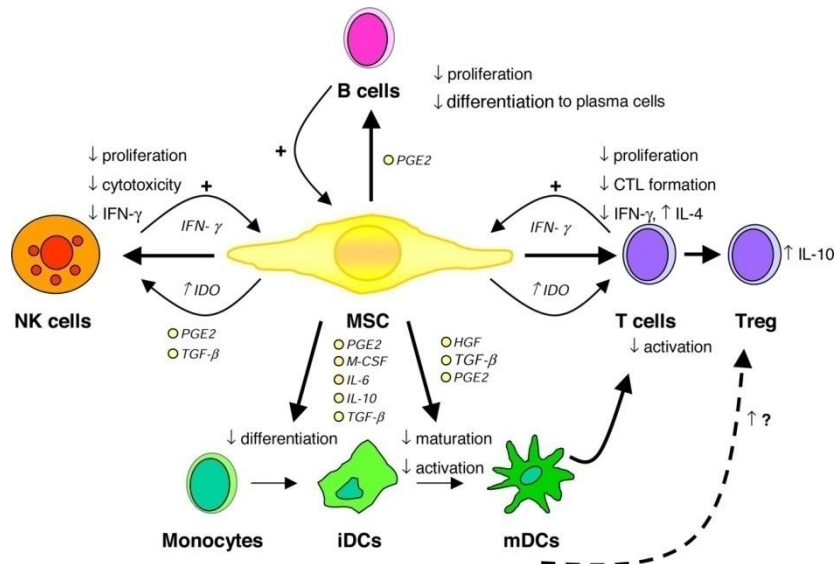


Figura I10: Principales efectos moduladores de las MSC sobre las células del sistema inmune innato y adaptativo. NK: Natural killer, i/mDC: célula dendrítica inmadura/madura, IDO: indolamina-2,3-dioxigenasa, PGE2: prostaglandina E2, TGF-β: factor de crecimiento transformante-β, M-CSF: Factor estimulante de colonias de estirpe monocítica. (Adaptado de Natua, 2007)

No sólo son células inmunoprivilegiadas, debido a la baja expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I (MHC-I) y a la ausencia de expresión de Clase II (MHC-II) y moléculas coestimuladoras en su superficie celular (Le Blanc, 2003, Majumdar, 2003. Chamberlain, 2007), sino que también interfieren con diferentes vías de la respuesta inmune por medio de interacciones directas célula-célula y secreción de factores solubles (Singer, 2011. Doorn, 2012). In vitro, los MSC inhiben la proliferación celular de células T, células B, células asesinas naturales (NK) y células dendríticas (DC), produciendo lo que se conoce como anergia (Maccario, 2005). Por otra parte, las MSC pueden detener una variedad de funciones de las células inmunes, como: la secreción de citoquinas y la citotoxicidad de las células T y NK; Maduración de células B y secreción de anticuerpos; maduración y activación de las DC, así como la presentación de antígenos. Igualmente se ha observado que las MSC reclutan linfocitos T reguladores (Tregs) tanto a los órganos linfoides como al lugar del injerto. En este escenario, un entorno inflamatorio parece ser necesario para promover su efecto. Algunas moléculas relacionadas con la inflamación como el TNFα y el IFNγ (de la Rosa, 2009) resultan fundamentales para ello.

Existe una gran controversia en cuanto a los mecanismos y moléculas implicados en el efecto inmunosupresor de las MSC. La prostaglandina E2, el factor de crecimiento transformante- β (TGF β), las interleucinas-6 y 10, el antígeno HLA-G5, las metaloproteinasas de matriz, la indolamina-2,3-dioxigenasa (Meisel, 2004; Munn, 2013) y el óxido nítrico se postulan todos como candidatos bajo investigación.

Aunque se han atribuido igualmente varias propiedades regenerativas a las MSC, sus mecanismos de acción sólo se comprenden parcialmente. Las MSCs sintetizan y secretan factores bioactivos, principalmente factores de crecimiento, que modulan la acción de las células adyacentes. Se ha demostrado que las MSC ejercen esta función a través de acciones paracrinas (Kinnaird, 2004). Por ejemplo, las MSC producen VEGF (Factor de crecimiento vasculo endotelial) e IGF-1 (Factor de crecimiento similar a insulina) que pueden actuar como factores angiogénicos y/o factores antiapoptóticos (Khubutiya, 2014). Las MSC directamente también a través de la acción paracrina promueven la migración (Walter, 2015), inducen la proliferación de fibroblastos (secretan SCF, factor de *stem cell*; LIF, factor de inhibición de leucemia y SDF-1, factor 1 derivado del estroma) y la osteogénesis promoviendo la proliferación, migración y diferenciación de osteoblastos (Li, 2016).

1.2.3.- MSC derivadas del tejido adiposo

La mayoría de los estudios realizados con MSC, se llevan a cabo con células procedentes de MO, y a pesar de que las MSC derivadas de tejido adiposo han sido menos estudiadas, es sabido que ambas poblaciones comparten muchas de sus propiedades esenciales (Puissant, 2005), como son la misma potencialidad y la misma capacidad replicativa, con una serie de ventajas añadidas como son la fácil accesibilidad y disponibilidad, el rendimiento superior (hasta 100 veces más de MSC extraídas/gramo de tejido) y que no se requiere movilización previa con factores externos.

La primera demostración de la existencia de células progenitoras mesenquimales en el estroma del tejido adiposo se produjo en el año 2000. Un grupo de investigadores liderado por Gimble, describieron la capacidad in vitro de estas células de diferenciarse a tejidos osteogénicos y mineralizar una matriz extracelular, cuando se las exponía a diferentes factores, demostrando la capacidad multipotencial de las células estromales residentes en el tejido adiposo (Halvorsen, 2000).

A pesar de estos primeros estudios, la primera vez que se consideró la existencia de células progenitoras mesenquimales en el tejido adiposo subcutáneo fue en el año 2001 cuando el grupo liderado por el Dr. Hedrick describió una población celular multipotencial (Zuk, 2001). Su descripción contemplaba la existencia de un grupo de células homogéneas con aspecto fibroblástico, obtenidas a partir de la fracción vasculo-

estromal (Figura I11) del tejido adiposo y con capacidad de diferenciarse a osteocitos, condrocitos y adipocitos. A estas células las bautizaron con el nombre de *PLA* (Processed Lipoaspirated) *cells*, células procesadas del lipoaspirado. Obtuvieron un gran número de células a partir de una pequeña muestra de lipoaspirado, que cultivaron sobre placas de Petri durante bastante tiempo, comprobando que cumplían uno de los requisitos de células progenitoras, la autorrenovación. Además, analizaron el fenotipo de dichas células mediante sus marcadores de membrana y analizaron su cinética de crecimiento; en ambos casos comprobaron que esta población celular cumplía los criterios estipulados para ser consideradas células mesenquimales progenitoras, siendo su fenotipo muy similar al descrito para las células mesenquimales progenitoras de la médula ósea.

Durante los últimos años, este grupo de células estromales con capacidad multipotencial ha tenido numerosos nombres en la literatura científica, entre los que podemos destacar: ADAS: Adipose-Derived Adult Stem cells, ADSC: Adipose Derived Stem Cells; ATSC: Adipose Tissue Stem Cells; MADS: Multipotent Adipose-Derived Stem cells; ASC: Adipose Stem Cells (Schäffler, 2007). En el año 2004, en el Congreso internacional de IFATS (Internacional Federation for Adipose Therapeutics and Science) se decidió unificar las diferentes nomenclaturas, dando como acrónimo ASC a las células troncales derivadas de la fracción vásculo-estromal del tejido adiposo.



Figura I11: Imagen histológica de tejido graso, donde se marcan los posibles nichos de células mesenquimales en la fracción vásculo estromal. Fuente: <http://www.ranf.com>: Monografía XXVII: Células Madre y Terapia regenerativa > García Olmo

Las ASC se han aislado de humanos y de otras especies de mamíferos mediante liposucción o mediante biopsias de tejido graso (Aust, 2004), utilizando un protocolo muy sencillo. Más concretamente, después de lavar con una solución salina el tejido obtenido y separar la fracción vásculo-estromal por centrifugación, el tejido es digerido mediante colagenasa para obtener células individuales, a continuación se lavan las células con una solución para destruir los restos celulares y hematíes y las células resultantes se añaden a placas de cultivo; pasadas al menos 4 horas (aunque habitualmente se suele dejar toda la noche), se pueden retirar las células que no se han adherido al plástico mediante una

simple aspiración del medio de cultivo y añadiendo medio nuevo, para que las células que se han adherido al plástico puedan crecer. Estas células se van replicando y se dejan en la placa de cultivo hasta que se obtiene una densidad próxima al 80% de confluencia. Una vez obtenida esta confluencia, las células se despegan de las placas de cultivo mediante tripsina-EDTA o mediante raspado en frío. Se pueden subcultivar y expandir hasta obtener la cantidad que se necesita. Dependiendo de los autores y de la especie animal, se suelen añadir entre 3.000- 5.000 células por cm², cambiando el medio de cultivo, para recuperar los nutrientes utilizados por las células, cada 3-4 días. La composición del medio de cultivo habitual es DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) al que se le añade un 1% de antibióticos y entre un 10-20% de suero bovino fetal (FBS, en sus siglas en inglés), es decir, el mismo medio que se utiliza para las células estromales obtenidas a partir de la médula ósea. La cantidad de fracción vásculo-estromal que se obtiene depende mucho de la especie animal e incluso dentro de una especie, del donador, así como de la región en la que se hace la liposucción, pero la mayoría de los autores describen para la especie humana, dos millones de células nucleadas por mililitro de lipoaspirado, del cual se pueden llegar a obtener cien mil células adherentes en una semana por mililitro de lipoaspirado (Jack, 2005). Y teniendo en cuenta que la frecuencia de células ASC en la región vásculo-estromal de la grasa subcutánea (5.000 CFU por gr. de tejido adiposo) es significativamente más alta que la cantidad de células estromales que se pueden obtener de la médula ósea (entre 100-1.000 CFU por ml.) suponen un gran atractivo (Yoshimura, 2006)

1.3.- TERAPIA CELULAR ALOGÉNICA

La elección de un tipo celular u otro no sólo dependerá de su plasticidad, sino también de su disponibilidad y su capacidad de expansión in vitro, lo que condiciona el número total de células que se pueden obtener. Además de la fuente de origen, las MSC pueden ser autólogas o alogénicas.

1.3.1.- Características y diferencias con la terapia celular autóloga

Las MSC autólogas son extraídas de un individuo, se tratan y/o expanden in vitro y se administran de nuevo en el sujeto. Con este tipo de procedimientos, se elimina la posibilidad de rechazo inmunológico y la contaminación por patógenos (Figura I12). En cualquier caso, no siempre es posible obtener MSC autólogas de pacientes que dada su patología son susceptibles a los procedimientos oportunos necesarios para su extracción. Con respecto a la preparación celular y la entrega, la alogenicidad resuelve los problemas logísticos de una terapia con células madre exitosa. Cuando se usa una fuente autóloga, el producto celular deriva de un paciente que generalmente es mayor y con múltiples

comorbilidades y el producto celular depende de la fabricación. El producto alogénico se puede expandir en cantidades que pueden resultar inalcanzables para la fuente autóloga. En comparación, la fabricación del producto autólogo puede requerir de 4 a 6 semanas para alcanzar números suficientes para la administración, y la capacidad de las células del paciente para expandirse es impredecible.

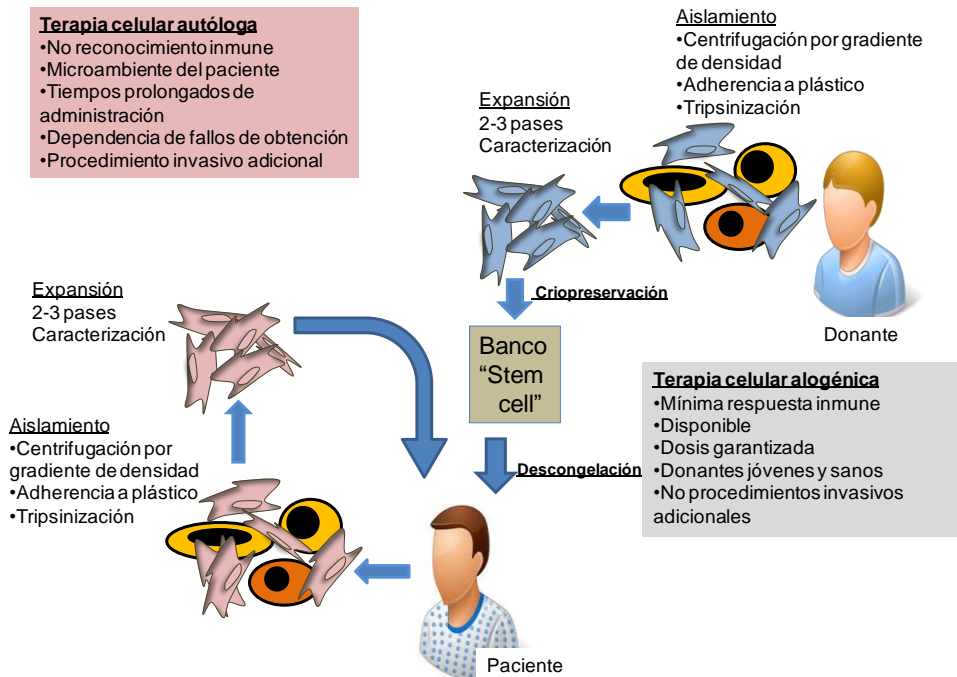


Figura 112: Comparación de terapia celular autóloga y alogénica. (Adaptado de Karantalis, 2015)

Las MSC alogénicas se extraen de un individuo ajeno al paciente, normalmente joven, inmunocompetente y sin enfermedades conocidas, se expanden a gran escala y se almacenan en un banco celular a dosis terapéuticas. Esta opción elimina las comorbilidades asociadas a la extracción, garantizan la dosis terapéutica y además al estar criopreservadas y listas para su uso en bancos se acortan los tiempos en el tratamiento con respecto a la opción autóloga.

La terapia alogénica es un concepto disruptivo, claramente evidente en el trasplante de órgano sólido y hematopoyético, en el que la inmunosupresión agresiva es la norma para proteger a los aloinjertos del rechazo (Chinen, 2010). A medida que el campo de la terapia celular evoluciona, se ha puesto de manifiesto que varios tipos de MSCs tienen suficiente capacidad para evadir (Ankrum, 2014) o suprimir el sistema inmunitario en la medida en que pueden usarse como aloinjertos sin necesidad de inmunosupresión concomitante.

En base a estas afirmaciones, en 1998 Klyushnenkova propuso el concepto de la generación de una gran oferta de MSC alogénicas de un donante universal en cultivo, que podría utilizarse para tratar a todos los pacientes (Klyushnenkova, 1998). Una vez que el potencial inmunomodulador de las MSC se estableció *in vitro* y en los primeros modelos

preclínicos, las MSCs se llevaron rápidamente a la clínica. En 2004, Le Blanc y colaboradores fueron de los primeros en administrar clínicamente MSCs alogénicas (alo-MSCs). Se trataban de MSC haplo-idénticas obtenidas de la madre de un niño de 9 años que sufría de un grado IV de enfermedad injerto contra huésped (GvHD). El niño recibió MSC 73 y 170 días después del trasplante de médula ósea, con una recuperación rápida después de cada infusión de MSC y supervivencia más allá de 1 año (Le Blanc, 2004). Tras esta publicación los ensayos clínicos que utilizan alo-MSC se multiplicaron y han sido impulsados predominantemente por empresas con propiedad de las preparaciones alogénicas, tales como Revascor de Mesoblast, MultiStem de Athersys, Stemdyne-MSC de Stemmedica, AC607 de Allocure, Cx601 de Tigenix, Stempeucel de Stempeutic y Trinity de Orthofix Evolución. Muchas de estas preparaciones derivan de un pequeño número de donantes, y las células están sujetas a una expansión en cultivo para generar dosis terapéuticas y tratar todo tipo de cohortes de pacientes. De hecho, un número creciente de estudios clínicos publicados de fase I y fase II de MSC alogénicas administradas para diversas afecciones médicas han descrito consistentemente la ausencia de complicaciones agudas a partir de dosis tan altas como 5×10^6 células / kg de peso (Vaes, 2012; Christopheit, 2008). Demostrando ser una terapia consistentemente segura y clínicamente eficaz en pequeños grupos controlados con placebo, permitiendo realizar ensayos futuros.

Una limitación potencial de la terapia con células estromales es que las MSC no persisten después de la infusión aunque se ha demostrado un tropismo hacia los sitios de inflamación. Imágenes de microscopía intravital, análisis de ADN y ARN del donante ó bioluminiscencia, han sido utilizados para constatar cómo la mayoría de células mueren en corto periodo de tiempo después de la infusión sistémica. En un modelo animal de infarto de miocardio en rata, MSCs de rata (diámetro promedio, 23 μ m) inyectadas intra-arterialmente y seguidas por microscopía intravital reveló que 92 +/- 7% (n = 6) de las MSCs detienen e interrumpen el flujo durante el primer pase por el nivel precapilar, lo que da como resultado una disminución del flujo en la arteriola de alimentación (Toma, 2009). También en un modelo de infarto de miocardio en rata pero con hMSC administradas de forma intravenosa, la cuantificación de ADN y ARN reveló la retención de las mismas como émbolos en el pulmón y desaparecían tras 24 horas (Lee, 2009) debido a su gran tamaño. En el mismo año, Kidd y colaboradores compararon la permanencia de hMSC por luminiscencia (marcadas con luciferasa) en ratones sanos ó con inflamación bien por lesiones o por tumores, demostrando que administradas sistémicamente en animales sin tumores las hMSC residen inicialmente en los pulmones, luego salen al hígado y al bazo y disminuyen la señal a lo largo del tiempo. Sin embargo, las hMSC en ratones heridos tienen tropismo y permanecen detectables solo en los sitios lesionados (Kidd, 2009). La tendencia de la muerte temprana de MSC después de la infusión se confirmó recientemente mediante el análisis de tejidos en la autopsia de hasta

18 pacientes que recibieron infusiones de alo-MSC un año antes de su muerte (von Bahr, 2012). El grupo de Le Blanc analizó los tejidos de estos pacientes que habían recibido MSC no compatibles o haploidénticas en MHC. En ninguno de ellos se observó tejido ectópico, pero sí se detectó ADN del donante MSC en uno o varios tejidos incluyendo los pulmones, ganglios linfáticos e intestino en ocho pacientes a niveles de 1/100 a $<1 / 1.000$. La detección del ADN del donante MSC se correlacionó negativamente con el tiempo transcurrido desde la infusión hasta la recogida de muestras. En cualquier caso se ha propuesto que el modo de acción de las MSC es a través de un mecanismo “*hit and run*” del inglés, es decir, ejercen su acción y son eliminadas en un corto espacio de tiempo.

Aunque las alo - y auto - MSC por igual no pueden persistir después de la infusión sistémica simplemente debido a limitaciones como son la deficiencia de nutrientes, falta de adherencia y/o factores de crecimiento (Muschler, 2004); un mecanismo inmunológico parece ser también responsable de la persistencia limitada de alo-MSCs. De hecho varias observaciones preclínicas y clínicas han llevado a varios grupos a cuestionar el estatus inmunológico privilegiado de las MSC y, posteriormente, la idea de usar un donante universal para la terapia MSC. Aunque la mayoría de los estudios *in vitro* han puesto de manifiesto las propiedades inmunosupresoras de las MSC, varios estudios han proporcionado evidencias de que las MSC de donantes incompatibles son inmunógenas.

Está ampliamente probado como en presencia de estímulos inflamatorios como el IFN γ , las MSC elevan la concentración en membrana del MHC de clase I y presentan MHC de clase II (Chamberlain, 2007. delaRosa,2009). Sin embargo, este aumento de expresión no se manifiesta para otras moléculas necesarias para la sinapsis inmunológica como son las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40L (Najar, 2012). Además, en condiciones inflamatorias, la molécula inhibidora CD274 (conocida por PD-L1) con efecto supresor sobre las células T activadas, también aumenta su expresión y puede ser un mecanismo inmunosupresor utilizado por MSC (Najar 2012; Briones 2011). Este perfil, es fundamental para el reconocimiento/inmunosupresión de los componentes de la inmunidad adaptativa. En cuanto al sistema inmune innato, las MSC presentan una expresión de los receptores como MICA / B y ULBPs (ligandos para NKG2D) muy baja o negativa en ASC (delaRosa, 2012), por lo que también escaparían al reconocimiento por parte de las células NK.

Los resultados de expresión de moléculas de membrana para dar lugar a sus especiales propiedades inmunoregulatoras son por tanto, contundentes y reproducibles, sin embargo, esto puede cambiar en la expansión a gran escala, por ello hay que tener en cuenta, que los diferentes pases necesarios para su mantenimiento *in vitro*, podrían modificar este perfil. A través del trabajo de Purandare y colaboradores, 2014, hemos conocido como los transcritos de ARN, para HLA de clase I medidos a través de PCR

inversa semicuantitativa, se mantienen relativamente estables durante la expansión (Purandare, 2014). Expresando niveles similares de HLA-A, HLA-B y HLA-C hasta el pase 20. Los RNA mensajeros para HLA-E daban una alta señal al inicio pero decrecían en los siguientes, mientras que para HLA-G y HLA-F no se detectó ninguna señal. Los transcritos para clase II varían significativamente, no así para HLA-DQA y HLA-DRB, en los que tras los diferentes pases la detección para todos ellos resultó negativa.

A pesar de su perfil poco inmunogénico, varios estudios *in vivo* en modelos animales han aportado observaciones de que las alo-MSC no manipuladas son capaces de provocar una respuesta de células T activadas bajo determinadas condiciones. Del mismo modo, la presencia de DSA circulantes en modelos animales con ratones, cerdos, macacos y babuinos ha sido testada (Griffin, 2013). Tanto con alo-MSC no manipuladas como con preactivadas como en el trabajo de Cho y colaboradores, donde se observó un infiltrado de células T tras la administración de MSC pretratadas con IFN γ en un modelo animal en cerdos. Rafei y colaboradores reportaron indicios similares en modelo experimental de EAE en ratón. Schu y colaboradores, claramente demostraron que ambas, BM-MSC alogénicas, no manipuladas y pretratadas con IFN γ , estimulaban la producción de anticuerpos en ratas lo que se asoció con un acelerado aclaramiento de un inóculo secundario de alo-MSC (Schu, 2013). Tras esta evidencia, demostraron la capacidad de estos anticuerpos para fijar complemento y mediar la lisis de las células donante *in vitro*.

El problema de todos estos trabajos, es la heterogeneidad en las vías de administración, dosis, número de inoculaciones y fuentes del tipo celular administrado. Se requiere por tanto un estudio prospectivo *in vivo* en donde se evalúe la respuesta inmune tras una administración de células alogénicas, y si es posible la duración de la supervivencia de una segunda administración del mismo donante en comparación con receptores naïve, lo que nos dará conocimiento de la naturaleza e intensidad de la respuesta provocada por la primera inoculación de las MSC alogénicas.

1.3.2.- ASC como alternativa terapéutica en la Enfermedad de Crohn

La enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria de etiología desconocida que puede afectar a cualquier parte del tracto gastrointestinal desde la boca hasta la zona perianal incluso presentar síntomas extraintestinales que pueden comprometer la piel, las articulaciones, la vía biliar y los ojos (Hendy, 2013, Torres, 2017). El origen exacto de la enfermedad es desconocido, pero se han reconocido factores inmunológicos, microbiológicos, ambientales y genéticos que aumentan el riesgo de padecerla. La hipótesis más aceptada en cuanto a la importancia de estos factores señala que existe una susceptibilidad individual determinada genéticamente, lo cual incide en que exista

una desregulación autoinmunitaria frente a determinados factores ambientales, como la microbiota, que representa uno de los más relevantes.

Los síntomas de la enfermedad de Crohn son heterogéneos, pero la gran mayoría de los casos se presenta con diarrea de más de 6 semanas de duración, dolor abdominal y pérdida de peso, en personas relativamente jóvenes. Un 40 a un 50% de los pacientes con enfermedad de Crohn presentan sangre o mucus en la materia fecal. También se presentan con frecuencia síntomas sistémicos como malestar general, anorexia o fiebre. El compromiso osteoarticular es la manifestación extraintestinal más frecuente, especialmente si existe compromiso del colon, presentándose dolor en articulaciones periféricas o en el esqueleto axial. La complicación más frecuente al momento del diagnóstico es la presencia de fístulas perianales (figura I13), en un 10% de los casos (Van Assche, 2010). La razón de su aparición es que el recubrimiento intestinal se puede ulcerar y formar canales de infección a los que denominan fístulas, las cuales forman túneles desde el área de ulceración, lo que crea un hueco que puede continuar hasta que alcanza la superficie del órgano o la superficie cercana a la piel. El único tratamiento actual es la cirugía. Sin embargo, no es curativa y lo que se busca alcanzar es atenuar los síntomas y mejorar la calidad de vida. Un 40 a un 70% de los pacientes requieren por lo menos una segunda operación dentro de los 10 años. El tratamiento quirúrgico, además, puede asociarse a complicaciones postoperatorias como el síndrome de intestino corto (cuando el intestino delgado se encuentra afectado) y fístulas anastomóticas.

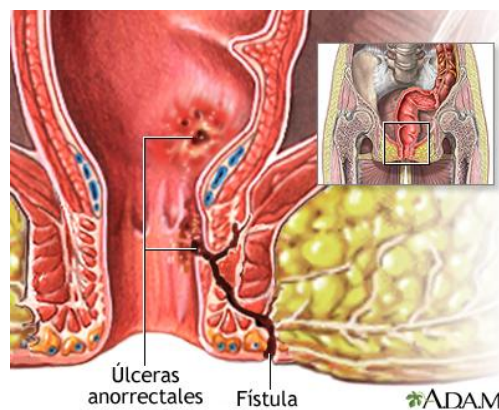


Figura I13: Representación de una fístula perianal.

La enfermedad de Crohn se caracteriza por períodos de actividad (brotes) e inactividad (remisión). Estos períodos varían según los pacientes, en algunos la remisión dura años; sin embargo en otros, se pueden producir brotes continuos. Las fases de remisión se caracterizan por la ausencia de síntomas, mientras en las fases de actividad se presentan mayoritariamente dolores abdominales, diarrea, vómitos, obstrucciones, fiebre, pérdida de apetito y pérdida de peso.

La necesidad de cuantificar la severidad de la enfermedad de Crohn y evaluar estadísticamente la respuesta a diferentes tratamientos en el marco de protocolos de investigación, requiere el uso de índices numéricos de actividad. Sin embargo, todos los que existen en la actualidad han sido cuestionados. La heterogeneidad de esta enfermedad dificulta la posibilidad de que un solo sistema sea usado eficazmente para evaluar sus diferentes patrones clínicos. En la actualidad, se reconoce que los índices clínicos no siempre reflejan la severidad de la enfermedad porque el valor de los signos y síntomas puede estar influenciado por la subjetividad del paciente o del médico. El índice de actividad de enfermedad de Crohn (CAI) es el que mayormente se usa en ensayos prospectivos, sin embargo los pacientes con enfermedad primariamente fistulizante, en especial perianal, muestran un score CAI relativamente bajo. Es por ello que no es un buen instrumento para evaluar la actividad de fístulas entero-cutáneas abdominales o perianales. En 1995, Irvine y col describieron un índice para medir la severidad de la enfermedad de Crohn perianal, que fue denominado “Índice de actividad de la enfermedad de Crohn perianal” (PDAI) (Tabla I2). Este índice consta de 5 variables, cada una de las cuales está graduada de 0 a 4 puntos, en función de si no presenta síntomas o los presenta de forma severa, de tal forma que un score alto implica una afectación severa de enfermedad perianal.

VARIABLE	AFECCIÓN	GRADUACIÓN
Drenaje de la fístula	<ul style="list-style-type: none"> - Sin drenaje - Mínimo drenaje mucoso - Drenaje mucoso ó purulento frecuente - Drenaje abundante - Drenaje fecaloideo 	<ul style="list-style-type: none"> 0 1 2 3 4
Dolor/restricción de la actividad	<ul style="list-style-type: none"> - Sin restricción - Incomodidad, sin restricción - Incomodidad frecuente, ocasional restricción - Incomodidad y limitación de actividad marcada - Dolor e importante restricción de actividad 	<ul style="list-style-type: none"> 0 1 2 3 4
Restricción de la actividad sexual	<ul style="list-style-type: none"> - No - Restricción ocasional - Limitación frecuente - Limitación importante - Incapacidad para actividad sexual 	<ul style="list-style-type: none"> 0 1 2 3 4
Tipo de enfermedad perianal	<ul style="list-style-type: none"> - Sin enfermedad - Fístul anal - <3 fístulas - >3 fístulas - Úlcera anal con afectación piel perianal 	<ul style="list-style-type: none"> 0 1 2 3 4
Grado de induración	<ul style="list-style-type: none"> - Sin induración - Induración leve - Induración importante - Induración llamativa - Absceso 	<ul style="list-style-type: none"> 0 1 2 3 4

Tabla I2: Graduación detallada de cada una de las 5 variables que conforman el Índice de actividad de enfermedad perianal, PDAI. Adaptado de Irvine, 1995

En la actualidad, la enfermedad de Crohn, no tiene cura, pero sí puede ser controlable y la mayoría de las personas pueden hacer una vida normal. El fin del tratamiento es evitar nuevos brotes o reducir la duración de los mismos. La terapia ambulatoria con medicamentos por vía oral es la más adecuada para la mayoría de los pacientes con enfermedad de Crohn leve a moderadamente activa. Los glucocorticoides se suelen emplear en los brotes agudos, y los inmunosupresores como la azatioprina, la mercaptopurina o el metotrexato, para mantener el efecto a largo plazo. En los últimos años se han desarrollado las llamadas terapias biológicas anti-TNF (Van Assche, 2010; Peyrin-Biroulet, 2008) como el infliximab y el adalimumab, que consiguen detener la inflamación, a veces de manera importante, cuyo uso es fundamental en aquellos pacientes refractarios a fármacos de primera línea.

Sin embargo, la naturaleza inflamatoria transmural de la enfermedad de Crohn predispone a la formación de fístulas y abscesos y muchas veces la cirugía junto con un tratamiento crónico de esteroides a dosis bajas y nutrición parenteral es su única opción. El tratamiento quirúrgico consiste en extirpar la parte del intestino afectada, quedando el paciente libre de síntomas a corto plazo, ya que nunca es curativa, y en la mayoría de los casos la inflamación reaparece cerca del lugar de la intervención.

TiGenix ha desarrollado una terapia celular alogénica para el tratamiento de la enfermedad de Crohn fistulizante perianal basada en la administración de células mesenquimales expandidas derivadas de tejido adiposo (eASCs; en sus siglas en inglés) (producto Cx601) cuyo objetivo terapéutico es el cierre completo de la fístula sin formación de abscesos, evitando así, la necesidad de intervención quirúrgica y mejorando la calidad de vida de los pacientes. El producto Cx601 (suspensión para inyección que contiene eASCs alogénicas administradas de forma local, Nº PEI: 12-023) cuenta con la designación de medicamento huérfano por la EMA (EU/3/09/667) y ha completado satisfactoriamente el ensayo previo en fase II (Cx601-0101, EudraCT: 2008-007445-31) para el tratamiento de las fístulas perianales complejas.

Sin embargo, existe un conocimiento muy limitado del efecto inmunobiológico de las ASC. Debido a esto, se considera de suma importancia que, en la medida de lo posible, se generen datos procedentes de pacientes tratados que puedan ser correlacionados directamente con los resultados clínicos, pudiéndose así confirmar el papel biológico real de las eASCs descrito en los estudios *in vitro* y en modelos experimentales de una forma mucho más detallada.

El ensayo clínico de Cx601 en fase III proveerá además un estudio prospectivo *in vivo* en donde se evalúe la respuesta inmune humoral tras una administración de células alogénicas, lo que permitirá conocer cómo el grado de alogenicidad influye en la terapia, y sobre los pacientes, a esperar sensibilizados o no sensibilizados. Todo ello generará datos de interés para futuras administraciones y para otros protocolos implantados en la terapia celular alogénica.

OBJETIVOS:

2.-OBJETIVOS

2.1.-Objetivo general:

El objetivo general del proyecto es **obtener una información de relevancia sobre la presencia y generación de anticuerpos anti-HLA así como su valor pronóstico, tras la administración local de ASC alogénicas en individuos con enfermedad de Crohn que presentan fístulas perianales complejas.** El presente proyecto pretende complementar el estudio sobre seguridad y eficacia dentro del desarrollo clínico de Cx601 en fase III. Se tomará como punto de partida el conocimiento, desarrollo y técnicas actuales en el campo del TOS.

2.2.-Objetivos específicos:

1. Estudiar si el uso de ASC alogénicas condiciona una respuesta humoral. Nuestro propósito es analizar los anticuerpos anti-HLA tras una administración local de forma prospectiva a los 3 y 12 meses, teniendo en cuenta el tipaje y expresión de los antígenos HLA del paciente y el donante de ASC.
2. Evaluar y comparar las técnicas de análisis de anticuerpos anti-HLA en un sistema diferente al TOS. Principalmente tecnología Luminex, análisis estructural de epítomos y pruebas cruzadas por citometría de flujo.
3. Definir los factores de riesgo asociados a la generación de anticuerpos anti-HLA. Evaluaremos como la compatibilidad HLA, el grado de inflamación previo del paciente y otras terapias concomitantes influyen en la respuesta humoral sobre las ASC alogénicas.
4. Determinar la pre-existencia de anticuerpos anti-HLA en pacientes presensibilizados y su evolución tras la administración de la terapia. Todo ello con el fin de conocer si existe una respuesta similar o diferente a los pacientes sin sensibilización previa
5. Relacionar la generación de anticuerpos anti-HLA con otros parámetros inmunológicos incluidos en el estudio. En paralelo a este trabajo el departamento de I+D de Tigenix estudiará las fluctuaciones en el sistema inmune de los pacientes tratados. De forma retrospectiva se pretende cruzar los datos y evaluar su relación.
6. Conocer el valor pronóstico tanto de la preexistencia como la generación de anticuerpos anti-HLA sobre la eficacia de las ASC. Pretendemos relacionar los anticuerpos con el mayor o menor cierre de fístulas perianales y eliminación de abscesos documentados a las 12, 24 y 52 semanas posteriores a la administración.
7. Definir la importancia de los anticuerpos anti-MICA en estos pacientes. Gracias a la cobertura que el ensayo de *screening* por tecnología Luminex nos brinda, también evaluaremos su relación con la eficacia clínica.
8. Proponer un algoritmo de monitorización para próximas administraciones de ASC alogénicas. Con los resultados que esperamos obtener al desarrollar los objetivos propuestos, tendremos herramientas suficientes para dirigir los efectos inmunes alogénicos.

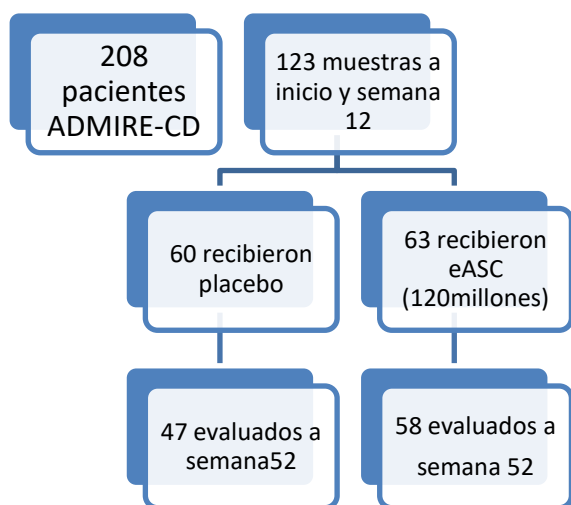
MATERIALES Y MÉTODOS:

3.-MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.-Diseño del estudio:

3.1.1-Características generales del ensayo clínico:

El trabajo forma parte del “Estudio en fase III, multicéntrico (52 centros de 7 países europeos y 1 centro en Israel; de los que España cuenta con el mayor número de centros participantes), aleatorizado y doble ciego para evaluar la eficacia y seguridad de una administración intralesional de 120 millones de eASCs alogénicas (5 millones de células /ml) , controlado con placebo (volumen de 24ml de solución salina) siguiendo el mismo esquema, para el tratamiento de la enfermedad de Crohn fistulizante perianal tras un periodo de 24 semanas (Estudio ADMIRE-CD) ampliado hasta la semana 52. Los pacientes serán evaluados clínicamente por los centros acreditados y se considerará una buena respuesta al tratamiento cuando presenten cierre completo del mayor número de fístulas tanto por tacto como por imagen con resonancia magnética.



En el estudio se incluyeron un total de 208 pacientes con enfermedad de Crohn y presencia de fístulas perianales, refractaria a al menos uno de estos tratamientos: antibióticos, inmunosupresores o anti-TNFs.

Se recogieron un total de 123 muestras de sangre periférica (en tubo EDTA) a modo de población representativa, al inicio (Visita 0; V0) y a las 12 semanas (Visita 2; V2). Un total de 60 y 63 pacientes recibirían placebo o la infusión de eASCs respectivamente. Sin embargo sólo de 105 (58 eASCs; 47 placebo) se pudo obtener muestra al año de la administración (Visita; V6), por lo tanto 18 pacientes no pudieron ser evaluados inmunológicamente al final de ensayo.

Las características demográficas arrojan una distribución homogénea en ambos grupos (tabla M1). De forma que un 48,8% de las muestras resultaron ser de pacientes placebo y un 51,2% de pacientes eASC(a), del mismo modo, pudo constatar la distribución por sexo (b). En cuanto a la edad (c) se obtuvo un rango de pacientes de entre 18 y 73 años, siendo la media de edad en el grupo de eASC de 35 años y en el grupo placebo de 38, por lo tanto, igualmente similar en ambos grupos. Otras de las características que fueron comparadas fue el tipo de terapia que llevaba cada uno de los pacientes al inicio del

ensayo, inmunosupresores o anti-TNF, las dos anteriores de forma combinada o ningún tipo de tratamiento (d).

	Grupo eASC		Grupo Placebo		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
a) Muestra poblacional	63	51,2	60	48,8	123	100
b) Sexo						
- Mujeres	32	50,8	27	45	59	48
- Hombres	31	49,2	33	55	64	52
c) Edad (años)						
- 18-35	33	52,4	28	46,6	61	49,6
- 36-65	30	47,6	29	48,3	59	48
- >65	-	-	3	5	3	2,4
d) Terapia concomitante						
- Inmunosupresores	11	17,5	10	16,6	21	17,1
- anti-TNF	23	36,5	20	33,3	43	34,9
- Combinada *	19	30,2	19	31,6	38	30,9
- Ninguna	10	15,8	11	18,3	21	17,1

*Terapia conjunta con inmunosupresores y anti-TNF

Tabla M1: Características demográficas de cada uno de los pacientes incluidos en el estudio, distribuidos según el tipo de tratamiento que les fue administrado en el ensayo (a), por sexo(b) y edad (c). Además cada uno de ellos llevaba asociado una terapia concomitante (d), en el que puede observarse que en la distribución por grupo también resultaron repartidos de forma homogénea.

Los pacientes fueron evaluados clínicamente al inicio del ensayo y para determinar la severidad de su enfermedad se utilizó el PDAI. Los pacientes que recibieron uno u otro tipo de administración mostraban entre 0 y 16 puntos de actividad (figura M1). Con una media de PDAI de 6 en el grupo eASC y de 7 en el que recibió Placebo.

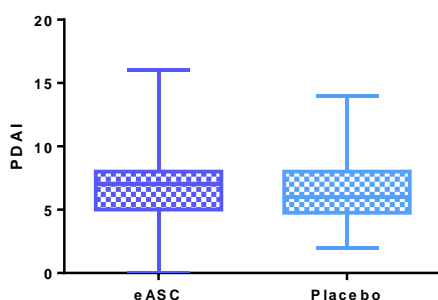


Figura M1: Distribución de los pacientes en los grupos de estudio en base a la severidad de la enfermedad según su PDAI.

3.1.2.-Obtención y conservación del material biológico:

3.1.2.1-Aislamiento y cultivo celular de las células mesenquimales

Las ASC se aislaron de la fracción vasculo estromal del lipoaspirado mediante liposucción de un donante adulto sano. Las ASC se obtuvieron después del consentimiento informado bajo los auspicios de los Comités de Ética e Investigación apropiados. Los lipoaspirados, se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se digirieron a 37°C durante 30 minutos con 18 U / ml de colagenasa tipo I en PBS (Invitrogen, Carlsbad, CA). La muestra digerida se lavó con 10% de suero bovino fetal (SBF), se trató con NH₄Cl 160 Mm para eliminar los eritrocitos restantes y se suspendió en medio de cultivo DMEM con 10% de SBF y se filtró. Las células se sembraron en matraces de cultivo de tejidos y se expandieron a 37°C y 5% de CO₂, cambiando el medio de cultivo cada 3-4 días. Las células se transfirieron a un nuevo matraz (103 células / cm²) cuando alcanzaron el 90% confluencia. Todos los estudios “in vitro” en los que se utilizaron ASC, correspondían al mismo donante que las administradas a los pacientes incluidos en el ensayo clínico.

3.1.2.2.-Plasma

Se recogió plasma de las diferentes muestras recogidas pre-Infusión, 12 semanas y 52 semanas tras la administración, en tubo con EDTA, mediante centrifugación a 2.000 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 min. Se congelaron varias alícuotas de cada paciente a -80°C para su posterior utilización en la detección de anticuerpos anti-HLA por citometría

Multiparamétrica xMAP y en las pruebas cruzadas con las ASC por citometría de flujo convencional.

3.1.2.3.- ADN de ASC y pacientes

Se extrajo el ADN de 1×10^6 ASC de la que con el kit comercial *chemagic DNA Blood250 KIT*; (PerkinElmer), de la misma forma se obtuvo ADN desde 250ul de sangre de los pacientes siguiendo indicaciones del fabricante. Se añaden 350ul de buffer con detergente para romper las membranas celulares. A continuación se administra 950ul de buffer de unión para posteriormente añadir 50ul de bolitas magnéticas con carga positiva que se unirán al ADN de la mezcla en 5 minutos de incubación a temperatura ambiente. Tras este tiempo se enfrenta la solución a un campo magnético y se retira el sobrenadante con la fracción no unida. Tras este paso se separa la alícuota de ensayo de la posición magnética y se añaden 800ul de buffer de lavado, se pipetea de nuevo y se coloca en la posición magnética una vez más, tras lo cual se retira el sobrenadante. Este paso de lavado se repite 2 veces más, y el último paso consiste en añadir al complejo ADN/bolitas magnéticas 150ul de buffer de elución (10 mM Tris-HCl pH 8.0) e incubar 15 minutos a 55⁰ C en termobloque con agitación. Finalmente se coloca la alícuota una última vez en la posición magnética y se recoge el sobrenadante que contiene el ADN de la muestra. El grado de pureza que se consigue con este método se establece con el A260/A280 ratio en el espectrofotómetro QUAWELL Q-3000(San José, CA, US) óptimo a 1,7 – 2,0.

3.2.-Metodología para la identificación de los anticuerpos anti-HLA

Se utilizaron para ello las muestras de plasma a V0, V2 de todos los pacientes, inicialmente a doble ciego, premisa por ser parte del ensayo clínico. En base a su resultado se cruzaron las diferentes sensibilizaciones con el tipaje HLA del donante ASC y el propio tipaje del receptor y se realizó una discriminación de las diferentes especificidades encontradas en combinación con un análisis estructural por definición de epítomos.

El plasma V6 fue analizado meses más tarde también para todos los pacientes.

3.2.1.-Técnicas de fase sólida.

La presencia de anticuerpos anti-HLA se determinó utilizando la tecnología de Luminex xMAP (Luminex Corporation, Austin, Texas) basada en principios de la citometría de flujo (Figura M2). En los últimos años, los ensayos en fase sólida se han consolidado como el “*gold standar*” en la determinación de los anticuerpos anti-HLA. En 1987, Wiley y colaboradores, identificaron la estructura molecular de la molécula HLA (Bjorkman,1987) de esta forma, fue posible desarrollar líneas recombinantes que representaran sólo una identidad HLA. Así nace la tecnología Luminex, añadiendo antígenos HLA a cada una de los *beads* o microesferas coloreadas para poder conocer la existencia de anticuerpos anti-HLA.

La técnica en fase sólida de Luminex es una modificación de la técnica clásica de citometría de flujo. En vez de células utiliza unas microesferas de látex que llevan adheridas en su superficie moléculas HLA, impregnadas de diferentes proporciones de dos colorantes fluorescentes (rojo e infrarrojo).

Usando diferentes relaciones entre los dos colorantes se diferencian varios tipos de esferas, cada una única y distinguible de las otras por medio de una luz láser, que las identifica basándose en el código de color que resulta del ratio entre los dos colorantes (figura M2). Los anticuerpos anti-HLA presentes en el suero del paciente se fijan a la molécula HLA correspondiente y se ponen de manifiesto mediante el agregado de una inmunoglobulina anti-IgG humana, marcada con un fluorocromo (normalmente ficoeritrina, PE). A continuación, con el citómetro Luminex LABScan 100, provisto de dos sistemas de láser, “lee” por una parte el fluorocromo (señal positiva) y por otra el color de la microesfera al que está asociado (especificidad).

Los resultados se analizan mediante un sistema informático asociado, que interpreta estas señales para llegar a un diagnóstico. Los resultados son semicuantitativos y permiten la categorización de los anticuerpos mediante la intensidad media de fluorescencia leída o IMF. Una forma de transformar los resultados a unidades de fluorescencia estandarizada (SFI normalizada) es tomando como base las fluorescencias

del ensayo Quantiplex™. El Quantiplex™ consiste en un set de microesferas, cada una de ellas con un determinado nivel de fluorocromo preestablecido. Su finalidad es cuantificar la fluorescencia de la ficoeritrina que lee el equipo Luminex. Los valores son valores MESF (Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome). Elimina las posibles variaciones que el equipo puede tener en las lecturas en momentos diferentes. Esto permite que una muestra procesada en repetidas ocasiones nos dé un valor MESF idéntico. Existen dos casas comerciales que distribuyen los reactivos Luminex, tanto para el escrutinio de anticuerpos, como para el estudio de las especificidades. En el Hospital Universitario Ramón y Cajal se ha trabajado con los reactivos de One Lambda Inc.® Canoga Park, CA, desde la implementación de la técnica. Según las recomendaciones de la casa comercial se utilizan 2 fases consecutivas de especificidad creciente. Una más grosera que nos permite conocer la existencia o no de anticuerpos y otra segunda que permite determinar las especificidades anti-HLA de los anticuerpos encontrados.

La primera resulta en la detección de anticuerpos anti-HLA y anti-MICA por LABScreen®Mixed (LSM). Mediante este ensayo se realiza un primer filtro de detección de anticuerpos anti-HLA, informando sobre la existencia o no de éstos. Para esta técnica se utilizan 12 microesferas de látex diferentes recubiertas con mezclas de antígenos HLA de clase I (HLA-A, HLA-B y HLA-C) 5 tipos de clase II (HLA-DR, HLA-DQ Y HLA-DP), y 2 tipos más con antígenos de moléculas de histocompatibilidad no clásicas (MICA). Cada tipo de esfera con antígenos de clase I tienen 3 identidades (equivalentes a los antígenos HLA de clase I de 3 fenotipos diferentes) y las de clase II tienen 5 identidades (equivalentes a 5 fenotipos de clase II).

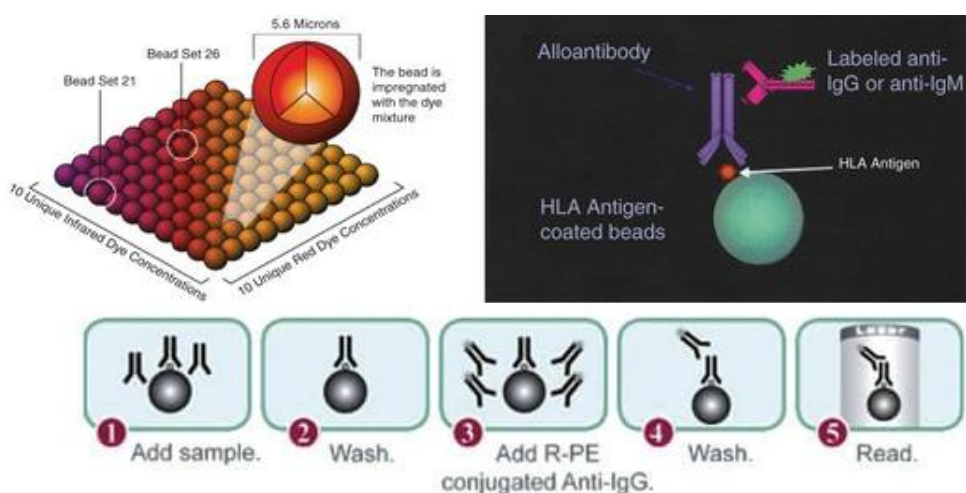


Figura M2: Principios básicos de la tecnología xMAP de Luminex para la detección de anticuerpos anti-HLA. Adaptado de www.onelambda.com

Siguiendo las instrucciones del fabricante:

Se añadieron 2.5µL de microbeads LABScreen® Mixed,(LSM) (One Lambda) recubiertos con antígenos purificados HLA y MICA por pocillo + 10µL de plasma para su incubación durante 30min a 20-25°C. Se colocó la placa con los pocillos de ensayo (cubierta con tapa y protector de luz color negro) en el agitador a velocidad media. Se lavó la placa con 100µL de WB (Wash Buffer 10x) diluido a 1x con agua destilada y se centrifugó a 3500rpm x 3min. Se descartó el sobrenadante mediante un golpe seco de la placa, y se volvió a repetir el lavado 2 veces. Luego, se diluyó el anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con PE a 1/100 y se añadió (100 µL/pocillo) a la placa que se volvió a cubrir para una incubación de 30min a temperatura ambiente en el agitador. Se realizaron 2 lavados como previamente se ha descrito y después del último lavado se añadió 80µL de WB para resuspender la muestra y posterior lectura en la plataforma Lambdascan100 y análisis mediante el software HLA Fusion (v3.3). Se consideraron positivos todos aquellos pacientes que superaran las 800 unidades de fluorescencia en al menos un tipo de microesfera.

La definición de las especificidades de anticuerpos anti-HLA por LABScreen®Single Antigen(LSA), permite detectar con gran precisión las identidades HLA. Cada microesfera (en total 100 en el ensayo de clase I y 100 en el de clase II) está recubierta por solo un antígeno, permitiendo identificar los alelos para todos los 11 locus HLA (A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA1, DQB1, DPBA1, DPB1).

Siguiendo las instrucciones del fabricante:

Se añadieron 2,5ul de microbeads LABScreen®Single Antigen (One Lambda) recubiertos con alelos purificados HLA de clase I+ 10µL de plasma para su incubación durante 30min a 20-25°C. El resto del método a seguir es el mismo que el anterior descrito. Una vez más el análisis se realizó con el software HLA Fusion (v3.3). En el laboratorio de Histocompatibilidad del Hospital Ramón y Cajal, los criterios de positividad para el ensayo de LSA (tabla M2) con los SFI que se obtienen son los que se muestran y los que se tomaron como referencia para este ensayo.

Especificidades anti-HLA	Valor SFI	Score
Positivas fuertes	>100.000 u.	8
Positivas	40-000-100.000 u.	6
Positivas débiles	20.000-40.000u.	4
dudosas	10000-20.000u.	2
negativas	<10.000u.	0

Tabla M2: Criterios de positividad definidos en el laboratorio de Histocompatibilidad del Hospital Ramón y Cajal, se incluye también un score que nos permitirá de una forma sencilla cuantificar los anticuerpos preexistentes donante específicos encontradas en los individuos presensibilizados.

3.2.2.-Elaboración de los patrones de respuesta.

Una de las herramientas que nos proporciona el sistema de análisis multiplex es el poder comparar muestras en tiempos diferentes para conocer si ha habido un cambio en la concentración de anticuerpos, así como un cambio en la detección de las diferentes especificidades. Tomando esta herramienta, desde la sección de histocompatibilidad del Hospital Ramón y Cajal, se estudian los diferentes análisis de LSM y desde una plataforma externa a HLA Fusion utilizando las medidas de IMF *RawDATA* (valor proporcionado por el equipo de análisis, referente a la fluorescencia bruta, sin aplicar ningún cálculo con respecto a valores positivos o negativos) para cada tipo de microesfera, con estos datos se elaboran patrones de respuesta (figura M3) que pueden compararse a distintos tiempos con las diferentes muestras del paciente de las que contemos.

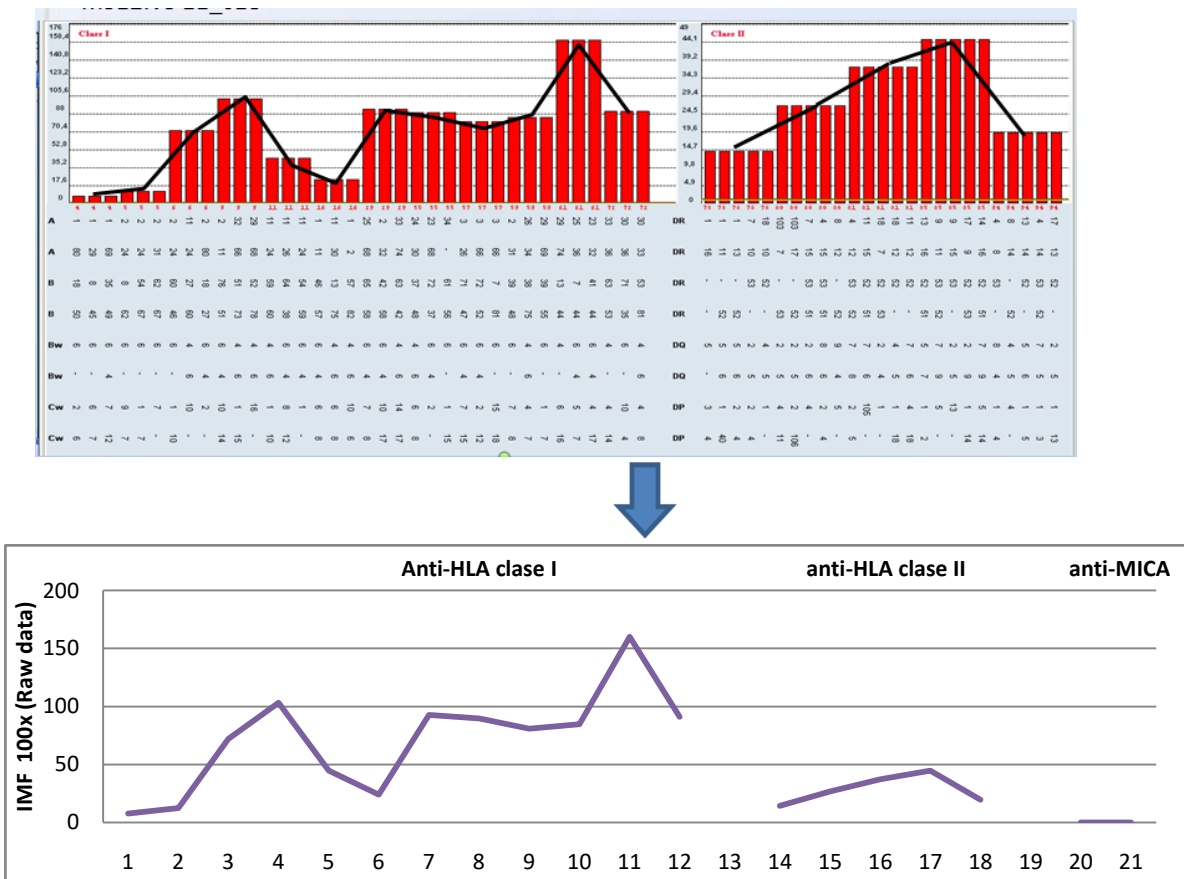


Figura M3: Ejemplo de elaboración de los patrones de respuesta. En el ensayo de LSM, existen 19 tipos de microesferas con una combinación de antígenos de HLA, 12 para clase I, 5 con antígenos de clase II y dos con antígenos MICA (histograma no mostrado). En la figura superior se muestra la imagen que el software HLA-FUSION nos proporciona. Para cada nivel de microesfera el programa recoge un valor de IMF bruta, si unimos cada uno de ellos, obtenemos una curva (Microsoft office Excel) tal y como se muestra en la figura inferior.

Con estos principios ideamos un código numérico, que se detalla como sigue:

Curvas V0 y V2	Código V0→V2	Tipo de respuesta alogénica de V0→V2	Tipo de paciente
Iguales y <800u.	0→0	No respuesta	Naïve sin respuesta
Diferentes y V2>800u.	0→1	R. de novo	Naïve con respuesta
Iguales y >800u.	1→1	No / de memoria	Presensibilizado sin respuesta
Diferentes y >800u.	1→2	De novo+ de memoria	Presensibilizado con respuesta

Tabla M3: Criterios de definición de respuesta humoral en base a los patrones de respuesta elaborados en el laboratorio de Histocompatibilidad del Hospital Ramón y Cajal.

3.2.3.-Algoritmo HLA Matchmaker

Se realizó el tipaje de un total de 61 pacientes que recibieron ASC (para dos de los pacientes no fue posible obtener muestra de ADN) por biología molecular con el ensayo Labtype SSO (ver siguiente punto).

Con la comprensión de que los anticuerpos anti-HLA reconocen epítomos dentro del antígeno, se ha hecho evidente que la compatibilidad entre donante y receptor debe evaluarse también a nivel estructural. HLA Matchmaker (Duquesnoy; 2002) es un algoritmo que considera a cada antígeno HLA como una serie de pequeñas configuraciones de residuos polimórficos, eplets, como componentes esenciales de epítomos dentro de la molécula de HLA. En nuestro estudio previo (CX601 en fase II) como en el actual, la relevancia de que los anticuerpos sólo se generaban frente a clase I, hizo que valorásemos la compatibilidad sólo teniendo en cuenta en primera instancia los locus A, B y C. Para ello se introdujeron los tipajes de los receptores y el donante en el programa *ABC Eplet Matching Macro V2.1_q.xls* suministrado desde la página <http://www.epitopes.net/>, (figura M4) y que de forma automática te da información de los eplets diferentes entre el receptor y el donante.

Date	1-Dec-16	Sort by Eplet	Sort by Alleles	Macro Shortcuts
PtName:	x	x	Donor Name	x
Recipient HLA		Donor HLA	mmEp	Eplets
A*0201		A*0205	0
A*0301		A*2402	3	... ,62EE,65GKA, ,166DG, ...
B*1801		B*1501	1	... ,44RMA,
B*5101		B*4901	4	... ,41T,44RKE, ,113YN,116L,
Cw*0702		Cw*0701	1	... ,65QNR,
Cw*1402		Cw*0302	3	... ,11AVH,173K, ,94I,

Figura M4: Ejemplo de determinación de eplets diferentes, basado en *Matchmaker*, entre un receptor del estudio y el tipaje de ASC. En este caso en concreto entre ambos existen 11 residuos polimórficos diferentes frente a los que se ha podido dirigir la respuesta alogénica.

Una vez obtenida esta información, pudimos cruzar los datos con las especificidades anti-HLA encontradas en cada muestra. Para ello se compararon los eplets del donante ASC que podrían ser alogénicos para cada paciente con la lista de especificidades encontradas

y así conocer si estas eran congruentes con el estímulo alogénico. Es decir, si cada tipo de especificidad encontrada llevaba asociada alguno de los eplets diferentes definidos.

3.3.-Tipificación HLA del donante ASC y los pacientes

Los antígenos HLA se determinaron mediante técnicas de biología molecular. En el donante, el tipaje de antígenos de clase I al igual que el de los pacientes, se realizó por la técnica genética Labtype SSO (One Lambda Inc.® Canoga Park, CA, EEUU) el tipaje de clase II del donante se hizo mediante PCR-SSP.

Históricamente, el método establecido para la determinación de los antígenos del sistema HLA ha sido la prueba de citotoxicidad linfocitaria. No obstante, con la llegada de la tecnología PCR, las técnicas de tipificación de tejidos basadas en el ADN se han convertido en habituales para los laboratorios. La especificidad de los alelos HLA amplificados por PCR-SSP (*polymerase chain reaction-sequence specific priming*) se determina por los iniciadores (primers). A diferencia de otros métodos basados en la tecnología PCR, el método SSP utilizado discrimina entre los diferentes alelos durante el proceso de amplificación. Cada par de iniciadores utilizados amplifica uno o varios alelos. El número total de iniciadores utilizados deberá amplificar todos los alelos conocidos para el locus a determinar. Dependiendo de su selección, la PCR-SSP puede ser de baja, mediana o alta resolución. En nuestro caso utilizamos la placa de 96 pocillos para baja resolución (MicroSSP™, SSP2L; One Lambda Inc.® Canoga Park, CA, EEUU) en la que pueden testarse los alelos DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 y DQB1. Los primers preoptimizados se presentan (liofilizados) en pocillos distintos de pared fina de 0,2 ml para PCR que ya está lista para añadir las muestras de ADN, polimerasa Taq recombinante y una mezcla de dNTP-tampón formulada especialmente (mezcla D-MIX de Micro SSP™) siguiendo las indicaciones del fabricante. En condiciones de PCR estrictamente controladas, los pares de primers perfectamente coincidentes dan lugar a la amplificación de las secuencias diana (es decir, un resultado positivo), mientras que los pares de primers no coincidentes no provocan amplificación (es decir, un resultado negativo). Después del proceso de PCR los fragmentos amplificados de DNA se separan por electroforesis en gel de agarosa y se visualizan por tinción con bromuro de etidio y exposición a la luz ultravioleta. La interpretación de los resultados de la PCR-SSP se basa en la presencia o ausencia de un fragmento específico de ADN amplificado. Además se incluye un par de primers como control interno en cada reacción de PCR que amplifica una región conservada del gen de la β -globina humana, que se encuentra en todas las muestras de DNA y que se utiliza para verificar la integridad de la reacción de la PCR.

Para la preparación del gel de agarosa se añaden 2,5 g de agarosa de grado electroforesis a 100 ml de tampón Tris Borato EDTA 1x (TBE 1x) con 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio (en

un frasco de vidrio de 500 ml). Calentamos hasta que se forma una solución homogénea y añadimos 30 ml de la solución de gel en la cubeta de electroforesis con los peines ya colocados. Dejamos reposar durante 15 minutos. Añadimos de nuevo TBE 1x por todo el gel, para llenar todos los pocillos. Una vez completada la PCR se transfiere cada reacción (10 μ l) por orden al gel de agarosa al 2,5% y se realiza la electroforesis de las muestras a 140–150 voltios hasta que el colorante guía haya migrado unos 0,5 cm en el gel. Finalmente se transfiere la cubeta a un transiluminador UV y se leen los resultados.

El genotipaje de HLA-I se realizó utilizando el ensayo LABType[®]SSO (One Lambda, Canoga Park, CA) que aplica tecnología Luminex a la tipificación inversa de ADN de SSO (Figura M5). El ADN de destino se amplifica por PCR utilizando un cebador específico de locus, en nuestro caso HLA-A –B y –C (RSSOHA, RSSOHB y RSSOHC, por alta resolución). El producto de PCR está biotinilado, lo que permite su detección con estreptavidina conjugada con r-PE (SAPE). El sistema de tipificación de ADN LABType[®] SSO proporciona sondas de oligonucleótidos específicos de secuencia inmovilizados en microesferas cifradas de forma fluorescente para la identificación de alelos HLA al hibridarse con los productos de la PCR. La intensidad de la fluorescencia y los patrones de reacción emitidos por los microbeads al pasarlos por el analizador de flujo LABScan 100, permiten el genotipaje de la muestra.

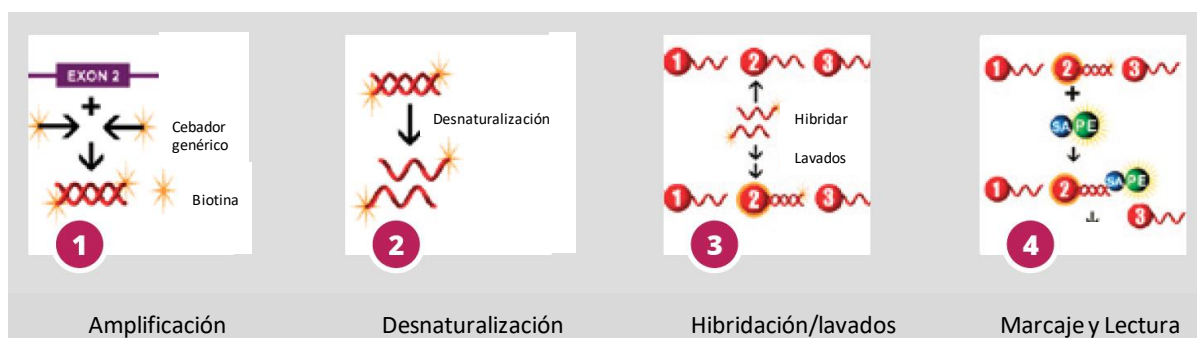


Figura M5: Esquema del procedimiento Labtype. Fuente: <http://www.rafer.es/rsso.html>

El protocolo resumido para el genotipaje de HLA-I por LABType SSO (Adaptado de www.onelambda.com) fue el siguiente:

- I. Amplificación: Se ajustó el ADN a 20ng/ μ l utilizando tampón de elución y se mezcló el volumen de D-mix y cebadores necesarios (Tabla M4). Acto seguido, se pipetearon 2 μ l de ADN ajustado a cada pocillo de la placa de PCR y se añadieron 18 μ l de la mezcla de amplificación (por cada muestra para un volumen total de 20 μ l/pocillo). La Taq polimerasa (AmpliAq[®]DNA Polymerase, Applied Biosystems, Foster City, California), se añadió al final en el volumen indicado (tabla M4). La PCR se realizó siguiendo los ciclos de temperatura marcados por el fabricante.

Nº de reacciones	D-mix(ul)	Cebador de amplificación (ul)	Taq polimerasa (ul)
1	13,8	4	0,2
10	138	40	2
50	690	200	10
96	1491	432	21,6

Tabla M4: Mezcla de amplificación por PCR para el ensayo Labtype SSO. *ul: microlitros*

- II. Desnaturalización: Tras la amplificación, se extrajo la placa de PCR del termociclador y se transfirieron 5 µl de cada pocillo a una nueva placa de PCR. Se añadieron 2,5 µl de tampón de desnaturalización + 5 µl de tampón de neutralización y se mezcló. Previo al tercer paso se mantuvo la placa de PCR en hielo.
- III. Hibridación: El termociclador se programó a 60°C para calentar el bloque térmico previo a su uso y se preparó la mezcla de hibridación (tabla M5). Se añadieron 38 µl de mezcla de hibridación a cada pocillo y se agitó la PCR en el vórtex a velocidad baja antes de colocarla en el termociclador a 60°C durante 15min. Tras la incubación se añadieron 100 µl de tampón de lavado a cada pocillo y se centrifugó la placa de PCR durante 5min a 1000-1300g. Esto se repitió hasta completar 3 lavados. Durante la tercera centrifugación se preparó la solución de SAPE (dilución 1/100 desde el reactivo SAPE de stock con tampón SAPE) y se añadieron 50ul por muestra.

Nº pruebas	Tampón de Desnaturalización	Tampón de neutralización	Tampón de hibridación	Tampón de lavado	Microesferas
1	2,5	5	34	480	4
10	25	50	340	4800	40
50	125	250	1700	24000	200
96	240	480	3264	46080	384

Tabla M5: Volúmenes necesarios (en microlitros) para preparar la hibridación para Labtype SSO

- IV. Etiquetado: En el último paso se añadió 50 µl de solución SAPE 1X/pocillo, y se agitó la PCR en el vórtex a velocidad baja. Luego, se introdujo la placa de PCR en el termociclador precalentado a 60°C e incubó 15 min. Se añadieron 100 µl de tampón de lavado a cada pocillo y se centrifugó la placa de PCR 5min a 1000-1300g. El sobrenadante se decantó y se añadieron 70 µl de tampón de lavado a cada pocillo para con una pipeta multicanal transferir el contenido de la placa de

PCR a una placa de lectura que se mantuvo a 4°C hasta su lectura en el analizador LABScan™ 100.

- V. Adquisición de muestras: Se utilizó el analizador LABScan™ 100 según las indicaciones del fabricante.
- VI. Interpretación de resultados: Se utilizó el programa HLA Fusion (v3.3).

Finalizados los análisis para la determinación del tipaje HLA de las ASC del donante, podemos afirmar que las ASC utilizadas en el presente ensayo clínico presentan los alelos:

A* 02:05	B*15:01	C*03:02	DRB1*01:01	DQB1*05
A*24:02	B*49:01	C*07:01	DRB1*11	DRB3+ DQB1*03:01

Tabla M6: Tipaje HLA de las ASC elegidas en el presente ensayo clínico.

3.4.-Medida de la expresión de HLA-I y -II de ASC en membrana:

Para valorar el grado de expresión de HLA de clase I y clase II de las ASC, utilizamos los anticuerpos monoclonales anti-HLA-I, clon W6/32 y anti-HLA-II, clon L243 (Becton Dickinson; Franklin Lakes, Nueva Jersey, EEUU) marcados con los fluorocromos PE y PerCP (*Peridinin Chlorophyll Protein Complex*) respectivamente. Utilizamos diferentes concentraciones (de 0 a 15ng/ml para el clon W6/32 y de 0 a 3ng/ml para el clon L243) para conocer la máxima señal y por lo tanto la concentración saturante para las moléculas de HLA tanto en condiciones basales como con las células estimuladas con IFN γ (3ng/100ul a 48h), en ambos procesos utilizamos una concentración celular de 50000ASC/100ul y marcamos con las concentraciones oportunas del anticuerpo conjugado durante 30 minutos en oscuridad a 4°C, lavamos con MACS buffer, centrifugamos a 1400rpm x 5 minutos y fijamos con 100ul de paraformaldehído 4% para su posterior lectura en el citómetro de flujo BD Fortesa.

3.5.-Detección de anticuerpos anti-HLA por citometría de flujo convencional (FCXM):

En el campo del trasplante de órgano sólido las pruebas cruzadas por citometría de flujo, se han implantado como una herramienta esencial para conocer el reconocimiento alógeno entre una pareja de donante y receptor y así evitar un posible rechazo humoral. De la misma forma nosotros quisimos testar el reconocimiento de los antígenos HLA de las ASC en su estructura conformacional por cada una de las muestras del grupo de ASC recogidas a modo de intentar reproducir los resultados “ex vivo”. Este proceso se llevo a cabo en dos condiciones distintas, con las ASC sin estimular (bajo grado de expresión de HLA, unASC) y estimuladas con IFN γ (inducción de la expresión de HLA, ASCy).

Para ello se incubaron 50000 ASC con 50ul de plasma V0, V2, y V6 de los pacientes del grupo ASC. El plasma fue previamente descomplementado a 56°C durante 30 minutos

para evitar la precipitación de las ASC y lavado una vez con MACS buffer a 3 minutos por 3500rpm. Tras una incubación de 30 minutos a TA en oscuridad con las ASC, se añadió sin lavar 250ul de complemento anti-HLA de conejo (CABC-1D, One Lambda Inc.® Canoga Park, CA, USA) durante 30 minutos a TA, se lavaron 3 veces con MACS buffer a 4'x 1500rpm y el pellet celular fue marcado con 20ul anti-IgG humana-FITC (Becton Dickinson; Franklin Lakes, Nueva Jersey, EEUU) tras 30 minutos en oscuridad a TA se lavó una vez más y se añadieron 10ul de 7-AAD durante 15 minutos para conocer la viabilidad, tras lo cual se analizaron todas las muestras en el citómetro de flujo BD Fortesa. Al igual que para los pacientes, se testaron como control negativo un "pull" de sueros de pacientes no sensibilizados y como control positivo un "pull" de sueros de pacientes hiperinmunizados de la lista de espera de trasplante renal del Hospital Ramón y Cajal. Para cada muestra se calculó el incremento de IMF obtenido al restar las unidades arbitrarias (u.a.) de IMF del control negativo a las u.a. de IMF de cada paciente. Tras aplicar el test estadístico de curvas ROC se definió un Δ IMF mayor a 15u.a. para considerar la prueba cruzada positiva.

3.6.-Estadística:

- a) Regresión lineal entre cada una de las técnicas utilizadas: Se utilizó para comparar los resultados obtenidos para cada uno de los pacientes entre el ensayo Luminex y la citometría de flujo convencional, así como para comparar la compatibilidad HLA entre los pacientes y las ASC tanto con la generación de anticuerpos como para la eficacia clínica.
- b) Curvas Roc: para definir puntos de corte en la FCXM
- c) ANOVA (Análisis de la Varianza) de doble vía: definir pronóstico de anti-HLA en base a la eficacia clínica con los cuatro grupos de pacientes definidos (placebo, no sensibilizados, sensibilizados de forma primaria y presensibilizados).
- d) Test t de Student: análisis de citoquinas y fenotipos en relación a la producción de anti-HLA entendidas como variables cuantitativas pareadas (entre V0 y V2 para los pacientes que generan anticuerpos) e independientes (grupo placebo y generadores o no generadores de anticuerpos a V0 y también a V2).

Todos los p-valores en los test estadísticos utilizados fueron de dos colas. Un valor de $p < 0,05$ (*) fue considerado estadísticamente significativo y $p < 0,01$ (**) muy significativo. El análisis estadístico con la información demográfica, datos clínicos e inmunológicos de cada paciente se realizó utilizando el paquete SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU). Los gráficos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

RESULTADOS

4.-RESULTADOS

4.1.-ANÁLISIS DE ANTICUERPOS ANTI-HLA.

Una de las premisas del ensayo clínico implicaba trabajar a doble ciego, es decir, las muestras no estaban identificadas en base a la administración recibida, bien de producto alogénico o solución salina. Este hecho supuso una ventaja para la valoración de la tecnología Luminex en este tipo de terapias, ya que no sólo comprobábamos la validez de la técnica para tal fin, sino que podríamos detectar a *posteriori* falsos positivos y por tanto identificar sus posibles causas.

4.1.1-Resultados a doble ciego

Una vez analizadas las 123 muestras previas a la administración (visita 0; V0), los resultados del ensayo LabscreenMixed (LSM) arrojaron un total de 22 pacientes presensibilizados al inicio del ensayo (tabla R1). En los datos suministrados por los especialistas clínicos, no encontramos antecedentes de trasplante, por lo tanto, se supuso que estas sensibilizaciones se debían a transfusiones o embarazos previos. De hecho, la mayor parte de los pacientes que presentaban anticuerpos anti-HLA previos eran mujeres (un total de 19, 86,3% de los pacientes presensibilizados). La mayoría de los anticuerpos detectados además, estaban dirigidos frente a antígenos HLA de clase I.

	No presensibilizados N: 101	Presensibilizados N:22		
	Anti-HLA negativo	Anti-HLA clase I positivo	Anti-HLA clase I y II positivo	Anti-HLA clase II positivo
Mujeres	61	7	9	3
Hombres	40	3	0	0

Tabla R1: Distribución de pacientes en base a sensibilizaciones previas por anticuerpos anti-HLA y sexo a visita 0.

Las muestras recogidas 3 meses tras la administración del producto (Visita 2; V2) se testaron de forma paralela. De los 123 pacientes, se determinaron un total de 22 nuevos positivos, todos ellos sólo frente a antígenos de HLA de clase I. Es decir, 22 muestras a V2 presentaron una intensidad media de fluorescencia (IMF) que superaba las 800 unidades en al menos una de las microesferas del ensayo LSM (Tabla R2), con respecto a las muestras correspondientes a V0 que eran negativas. Tras la apertura del doble ciego, de los 22 pacientes caracterizados con presencia de anticuerpos anti-HLA por LSM, 18 correspondían al grupo ASC (administración ASC alogénicas) y 3 a individuos placebo, es decir, habían recibido una administración sin producto alogénico. Se hizo necesario por tanto, realizar un cribaje de estos resultados, analizando IMF de cada una de las muestras y comparar los resultados obtenidos por LSM los con patrones de respuesta. Como se

describe en el punto 3.2 de materiales y métodos, este análisis radica en detectar no sólo el traspaso del punto de corte establecido, sino el cambio en el perfil de las IMF de las microesferas del LSM entre una muestra y la posterior. De modo que para cada muestra, al representar cada IMF obtenida para cada una de las microesferas del LSM, tanto para HLA de clase I como para HLA de clase II y unir los puntos que se obtienen, obtuvimos una curva de cada visita de los pacientes del ensayo y se compararon. Igualmente para todas las muestras con LSM positivo, se confirmó la presencia de anticuerpos anti-HLA con el ensayo de especificidad Labscreen single Antigen (LSA).

	Grupo ASC N: 63		Grupo Placebo N: 60	
	V0	V2	V0	V2
Anti-HLA negativo	51	33	50	47
Anti-HLA clase I positivo	4	22*	6	9*
Anti-HLA clase I y II positivo	2	2	3	3
Anti-HLA clase II positivo	6	6	1	1

Tabla R2: distribución de pacientes a V0 y a V2 en el grupo ASC y placebo en base a los resultados del LSM.*Todos las muestras positivas se confirmaron con patrones de respuesta y LSA, modificando en aquellos casos que así lo requiriesen su valor.

De las 3 muestras a V2 que resultaron positivas por LSM y pertenecían al grupo placebo, sus patrones de respuesta (figura R1) revelaron que no superaban las 1200 unidades de fluorescencia para clase I (puntos del 1 al 12). Por lo tanto, se situaron en lo que la literatura describe como la zona gris, es decir, zona de positivos dudosos. En los pacientes con código interno 018 y 003, las curvas representadas para V0 (azul) y V2 (rojo) además eran relativamente superponibles, es decir, no hubo una modificación en el perfil de fluorescencias encontradas, tan sólo un aumento en la intensidad, que se pone de manifiesto al comparar los controles negativos de ambos tiempos. En ambos pacientes el control negativo fue superior en V2 (dato no mostrado) lo que coloquialmente se conoce como un aumento del fondo. En cualquier caso, tras el análisis consecutivo por LSA, el resultado puso de manifiesto, sobretodo en el paciente 082 que se trataba de un positivo dudoso cuya confirmación con una técnica más específica concluyó la no existencia de una respuesta humoral, ya que no se encontró ninguna señal positiva en las especificidades testadas para clase I.

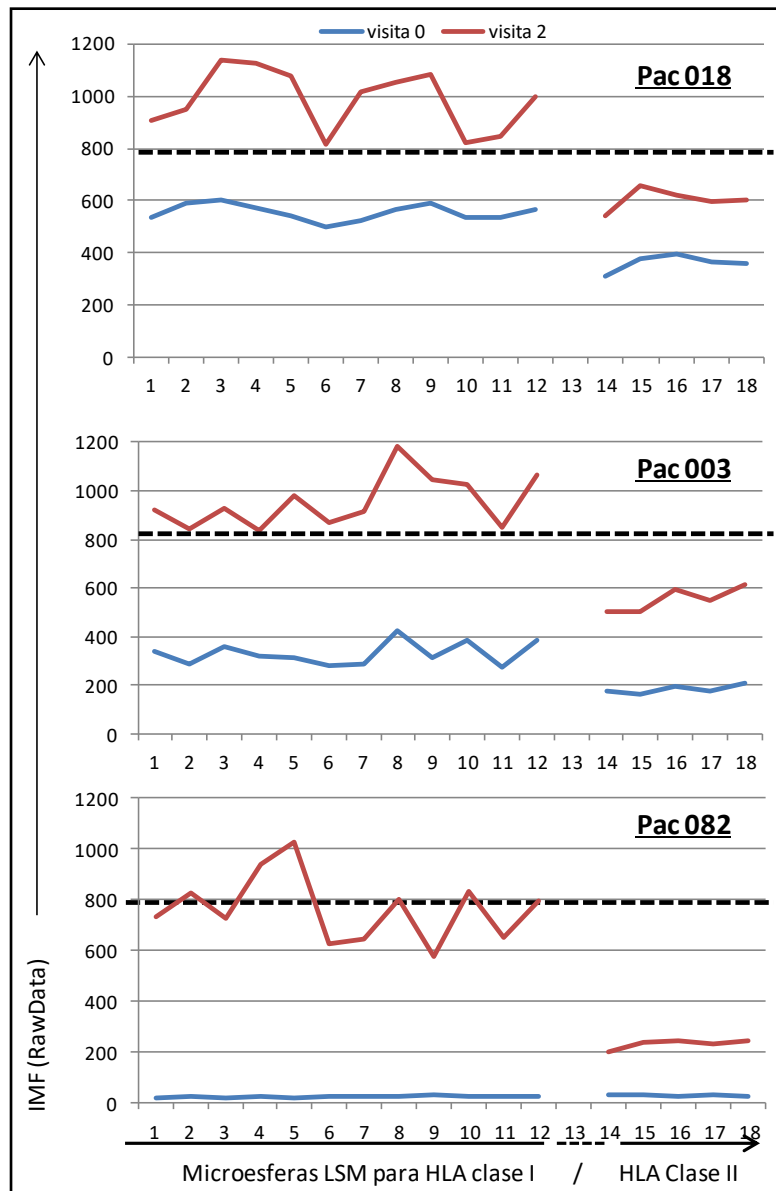


Figura R1: Patrones de respuesta para los pacientes que recibieron placebo y resultaron LSM+ a V2. Se representan las IMF (en fluorescencias brutas; Raw Data) frente a las microesferas del ensayo LSM para clase I (puntos del 1 al 12) y clase II (14 a 18) en las muestras a V0 (azul) y a V2 (roja). IMF: *Intensidad media de fluorescencia*. LSM: *labscreen mixed*.

Para los pacientes 018 y 003, en el ensayo de LSA se encontraron especificidades positivas, aunque la mayoría de ellas pertenecían al locus C y sin presentar una clara relación con el tipaje de ASC utilizado en el ensayo. Este tipo de falsos positivos suelen aparecer en el campo de la histocompatibilidad y ha sido ampliamente descrito en la literatura, donde se han establecido especificidades anti-HLA frecuentes en la práctica clínica, encontradas en individuos no aoinmunizados y que se adscriben con asiduidad a lo que se conoce como anticuerpos naturales (Morales-Buenrostro, 2008) cuya existencia es debida a reacciones cruzadas con residuos existentes en anticuerpos presentes en el

suero de los pacientes específicos frente a algunos microorganismos, proteínas de la dieta o alérgenos, (Tabla R3). Recordemos que las moléculas HLA presentes en las microesferas del ensayo por Luminex, son HLA recombinantes, que no van acompañados de la beta2 microglobulina ni de ninguna molécula alojada en su bolsillo de presentación antigénica, lo que deja expuesto epítomos en la molécula de HLA recombinante que en condiciones fisiológicas no lo están (neoepítomos), pudiendo derivar en falsos positivos en la técnica (El-Awar, 2009).

Anticuerpos anti-HLA de clase I						Anticuerpos anti-HLA de clase II	
Especificidades locus A		Especificidades locus B		Especificidades locus C		Especificidades locus DR	
	%		%		%		%
A*3002	18.9	B*1512	11.1	Cw*1701	11.3	DRB1*0404	5.4
A*3101	11.3	<u>B*8201</u>	10.4	<u>Cw*0202</u>	5	Especificidades locus DQ %	
A*8001	8.5	B*1516	9.9	Cw*0302	4.7	DQA1*0503/DQB1*0301	10.8
A*3401	6.8	B*3701	7.8	Cw*0602	4.2	DQA1*0601/DQB1*0301	10.6
<u>A*6602</u>	6.6	B*4402	6.1	Cw*0303	4	DQA1*0303/DQB1*0301	9.4
<u>A*4301</u>	5.9	B*4501	5.9	<u>Cw*0501</u>	4	DQA1*0505/DQB1*0301	8.3
A*6601	5.9	B*8101	4.7	Cw*0102	3.8	DQA1*0301/DQB1*0301	6.1
A*0101	5.7	B*0801	4.5	→ <u>Cw*0401</u>	3.8	DQA1*0501/DQB1*0201	3.5
A*2501	5.7	B*5401	4.2	Cw*1502	3.5	DQA1*0102/DQB1*0502	3.3
A*3301	5.2	B*4201	3.8	Cw*1802	3.1	Especificidades locus DP %	
A*1102	4.5	B*5601	3.8			DPA1*0201/DPB1*0101	20.5
A*0203	4.2	B*0702	3.3				
A*2402	4	B*5501	3.3				
A*2601	3.5	B*5703	3.3				
A*3001	3.5	B*6701	3.3				
A*3303	3.5	B*1502	3.1				
A*2403	3.3						
<u>A*2902</u>	3.1						
A*7401	3.1						

— Pac 003
 - - - Pac 018
 → Pac 004

Tabla R3: Frecuencias de especificidades anti-HLA encontradas en donantes sanos no alo-inmunizados por el ensayo de LSA. Se señalan las especificidades que se encontraron en los pacientes 003 (subrayado continuo), 018 (subrayado discontinuo) y 004 (flecha), falsos positivos del grupo placebo y ASC respectivamente, en el ensayo. Adaptado de Morales-Buenrostro y col., 2008.

Teniendo en cuenta estas limitaciones del análisis LSM, buscamos en el grupo ASC, pacientes que hubieran tenido resultados similares, es decir, positivities bajas en el LSM, patrones de respuesta sin cambio y especificidades por LSA no concordantes con el tipaje del donante ASC. Con esta premisas, encontramos un individuo que sí recibió ASC y cuyo LSM a V2 también fue positivo dudoso y el ensayo LSA de clase I, revelaba especificidades relacionadas con anticuerpos naturales y no concordantes con el tipaje del estímulo alogénico, a diferencia de los resultados en el LSA para el resto de pacientes positivos que habían recibido ASC. Este paciente (cuyo código interno era el 004) fue catalogado como positivo dudoso con IMF inferiores a 1200 unidades en el LSM y en el ensayo de LSA, la única especificidad que superaba las 10000 unidades de IFS era HLA-C*04 (18000 unidades de IFS), incluida nuevamente en el listado de anticuerpos naturales. Por ello, el paciente 4 se catalogó también como un falso positivo de la técnica LSM

Agrupando los datos anteriores, de las 123 muestras de la visita 2 analizadas, 4 de ellas se consideraron falsos positivos, primero por presentar fluorescencias bajas, positivos dudosos. En dos de ellos además, las patrones de respuesta fueron superponibles, es decir, ya nos advertían de una posible negatividad por LSA. Y en segundo lugar, porque entre las especificidades testadas no encontramos ninguna coincidente con los antígenos del donante de ASC, es más, se relacionaban con las descritas como frecuentes en reacciones cruzadas con anticuerpos naturales. Así, el ensayo LSM por tecnología Luminex, al igual que en otras terapias basadas en trasplantes alogénicos, ha sido una herramienta útil y específica para detectar la presencia de anticuerpos anti-HLA o no en muestras de plasma y suero de pacientes que han recibido la administración de células mesenquimales derivadas de tejido adiposo. No obstante, la combinación con el análisis por patrones de respuesta más el análisis consecutivo LSA con discriminación de especificidades encontradas según el tipaje del estímulo alogénico, permitió una definición correcta y completa de los anticuerpos anti-HLA en individuos sensibilizados.

Un total de 63 pacientes recibieron una administración local (en la zona afectada con fístulas perianales) de ASC alogénicas no preactivadas a una concentración de 120 millones en 5 mililitros. 12 pacientes presentaban anticuerpos anti-HLA de forma previa y fueron valorados de forma independiente (ver siguiente punto).

Al comparar las muestras al inicio (V0) y a los 3 meses (V2) tras haber filtrado los falsos positivos, 17 nuevos pacientes (32,7%) presentaron anticuerpos anti-HLA dirigidos únicamente frente a moléculas HLA de clase I a V2. No se detectó ningún cambio ni nueva positividad para las microesferas de LSM con antígenos HLA de clase II en ninguna de las muestras. Por ello, se decidió realizar solo el ensayo LSA específico para clase I con las muestras V2. Para todos ellos se comprobó que las especificidades encontradas eran congruentes con el tipaje tanto del donante de ASC (Tabla R4) como con los antígenos HLA que presentara cada receptor. Acorde a los criterios establecidos, solo las especificidades que superaran las 10000 unidades de IFS serían tomadas en consideración. Comprobamos además, como en algunos de ellos, no todos los anticuerpos anti-HLA donante específico (ADES) resultaban positivos, sin embargo, se correspondían con antígenos presentes en cada receptor, es decir, frente antígenos HLA coincidentes no se generaron anticuerpos anti-HLA.

Paciente (referencia a V2)	Labtype ^{SSO}			Labscreen [®] Single Antigen class I (IFS)					
	#RSOH1AT	#RSOH1BT	#RSOH1CT	#LSA1A04 lote9					
	Locus A	Locus B	Locus C	A*02:01	A*24:02	B*15:01	B*49:01	C*03:02	C*07:02
2B	A*02:01 A*03:01	B*08:01 B*35:01	C*04:01 C*07:01	0	0	0	0	10137,49	4684,21
20B	A*03:01 A*03:01	B*35:01 B*38:01	C*02:02 C*12:03	415503,12	240500,39	284493,91	263940,38	4375,02	9649,53
21B	A*01:01 A*23:01	B*08:01 B*14:01	C*07:01 C*08:02	37517,21	2880,57	42358,06	78155,38	6816,89	7999,44
25B	A*02:01 A*03:01	B*18:01 B*51:01	C*07:01 C*14:02	0	152587,11	277975,06	320905,69	6679,35	1057,26
28B	A*03:01 A*11:01	B*07:02 B*35:01	C*04:01 C*07:02	126465,32	211376,34	136398,3	350082,72	9141,5	1219,21
33B	A*01:01 A*68:01	B*18:01 B*49:01	C*07:01 C*08:02	142915,34	220310,77	123240,34	0	12740,5	6472,66
34B	A*01:01 A*30:01	B*08:01 B*18:01	C*07:01 C*12:03	17539,6	39346,41	90022,81	124793,09	0	0
56B	A*68:01 A*74:01/02	B*15:03 B*15:03	C*02:02 C*02:10	144032,42	62285,52	5730,48	52200,65	0	0
67B	A*02:01 A*03:01	B*07:02 B*44:02	C*05:01 C*07:02	0	69971,58	109489,8	228959,62	74975,51	0
70B	No DNA			28579,35	39174,5	28518,74	24075,59	27915,96	11470,76
75B	A*24:02 A*29:02	B*14:02 B*45:01	C*02:02 C*06:02	236682,77	2122,98	362811,28	408546,94	99284,58	13883,71
77B	A*03:01 A*23:01	B*44:03 B*51:01	C*04:01 C*07:02	408479,31	239181,89	421105,62	396965,88	51443,94	7853,91
81B	A*01:01 A*03:01	B*07:02 B*08:01	C*07:01 C*07:02	202107,17	123476,55	199669,52	294446,12	50806,14	128,03
83B	A*01:01 A*03:01	B*57:01 B*57:02	C*04:01 C*06:02	335902,84	196938,06	361126,75	379549,44	155692,5	96051,85
89B	A*02:01 A*02:01	B*40:02 B*57:01	C*06:02 C*12:03	0	52228,52	70557,8	110014,48	0	0
92B	A*03:01 A*03:01	B*07:02	C*07:02 C*07:02	344065	451864,91	453345,41	478083,78	117518,88	16852,66
123B	A*02:01 A*03:01	B*15:01 B*27:07	C*:03:03 C*15:02	0	52142,33	0	104136,16	0	10187,66

Tabla R4: listado de los 17 pacientes sensibilizados tras la administración de ASC con los resultados del LSA de clase I a V2 para los anticuerpos anti-HLA donante específicos (ADES) y la determinación de los antígenos HLA de cada individuo realizado por Labtype^{SSO}. Se señalan en negrita los antígenos coincidentes entre receptor y donante (A*02:01, A*24:02, B*15:01, B*49:01, C*03:02 y C*07:01).

4.1.2.-Respuesta anti-HLA en los individuos presensibilizados.

La detección de nuevas sensibilizaciones en los pacientes presensibilizados supone un trabajo extra en el campo de la histocompatibilidad, ya que normalmente, las muestras pre-trasplante y post-trasplante presentan anticuerpos anti-HLA. En el total de los individuos presensibilizados del ensayo, todas las muestras analizadas, desde V0 a V6, resultaron positivas por LSM, lo que supone un inconveniente para discriminar la respuesta anti-HLA propia y específica de la administración del producto celular alogénico. Sin embargo, el ensayo LSM, como ya se ha visto en el punto anterior, fue altamente reproducible. Esto supuso una gran ventaja a la hora de comparar muestras, pues el patrón de respuesta no varió significativamente entre unas y otras en los casos en los que no hubo un cambio en el abanico de especificidades anti-HLA que ya presentara el paciente.

En nuestra cohorte de 63 pacientes que recibieron ASC, había un total de 12 pacientes con anticuerpos anti-HLA previos (ver tabla R2) y 10 pacientes de los 60 del grupo Placebo. Ninguno de ellos negativizó sus títulos tras la administración.

Entre los pacientes presensibilizados que recibieron el producto alogénico, se encontró una respuesta heterogénea. En primer lugar, tras realizar el análisis LSM, comprobamos cómo las especificidades de anticuerpos anti-HLA de clase II no se modificaron en ninguno de ellos. Debido a este resultado, los 2 pacientes con sólo anticuerpos anti-HLA de clase II se incluyeron en el grupo de no sensibilizados (al menos para HLA de clase I). Sin embargo, pudimos diferenciar a los 10 pacientes presensibilizados restantes en dos grupos en función de que presentaran o no nuevas especificidades anti-HLA a V2.

Los patrones de respuesta de las visitas 0, 2 y 6 (figura R2) fueron de gran utilidad para identificarlos, incluso de forma previa al ensayo de LSA, ya que encontramos pacientes con un patrón de respuesta entre V0 y V2 con diferencias entre los picos y valles de las gráficas y pacientes con patrones de respuesta superponibles; patrón 1→2 ó patrón 1→1 respectivamente (ver capítulo 3.2 de materiales y métodos). La razón de esta clasificación fue porque únicamente el grupo que mostró un cambio en el patrón (patrón 1→2) presentaría nuevas especificidades anti-HLA por LSA a los 3 meses tras la administración.

Esta relación se comprobó por el ensayo de LSA para clase I, que confirmó la información revelada por los patrones de respuesta. Las IMF de los ADES, es decir, aquellas especificidades anti-HLA propias del tipaje HLA del donante de ASC, eran negativas o débiles a V0 en los pacientes con patrón 1→2 y se tornaban positivas a V2 (figura R3). En cambio los ADES de los patrones 1→1 no se modificaban; en los pacientes 1 y 2 eran negativos para ambas muestras y en los pacientes 3 y 4 positivos en las dos visitas con aumento de IFS en V2. Por lo tanto, los pacientes con patrón 1→1, es decir, sin una respuesta *de novo*, a su vez, se podrían diferenciar en dos subgrupos, uno en los que no aumentaron el título de anticuerpos (pacientes 1 y 2) y otro (pacientes 3 y 4) que presentaron IMF superiores en la muestra a las 12 semanas con respecto a la inicial.

Este resultado, ya evaluado previamente en el ensayo de CX611 en fase II en artritis reumatoide refractaria (ver anexo) es importante, pues permite no tener que realizar el ensayo LSA en todas las muestras de pacientes sensibilizados, para distinguir nuevas sensibilizaciones, lo que supone un coste económico y de tiempo añadido que puede ser evitado con la utilización de los patrones de respuesta tras la evaluación de las muestras por el ensayo LSM.

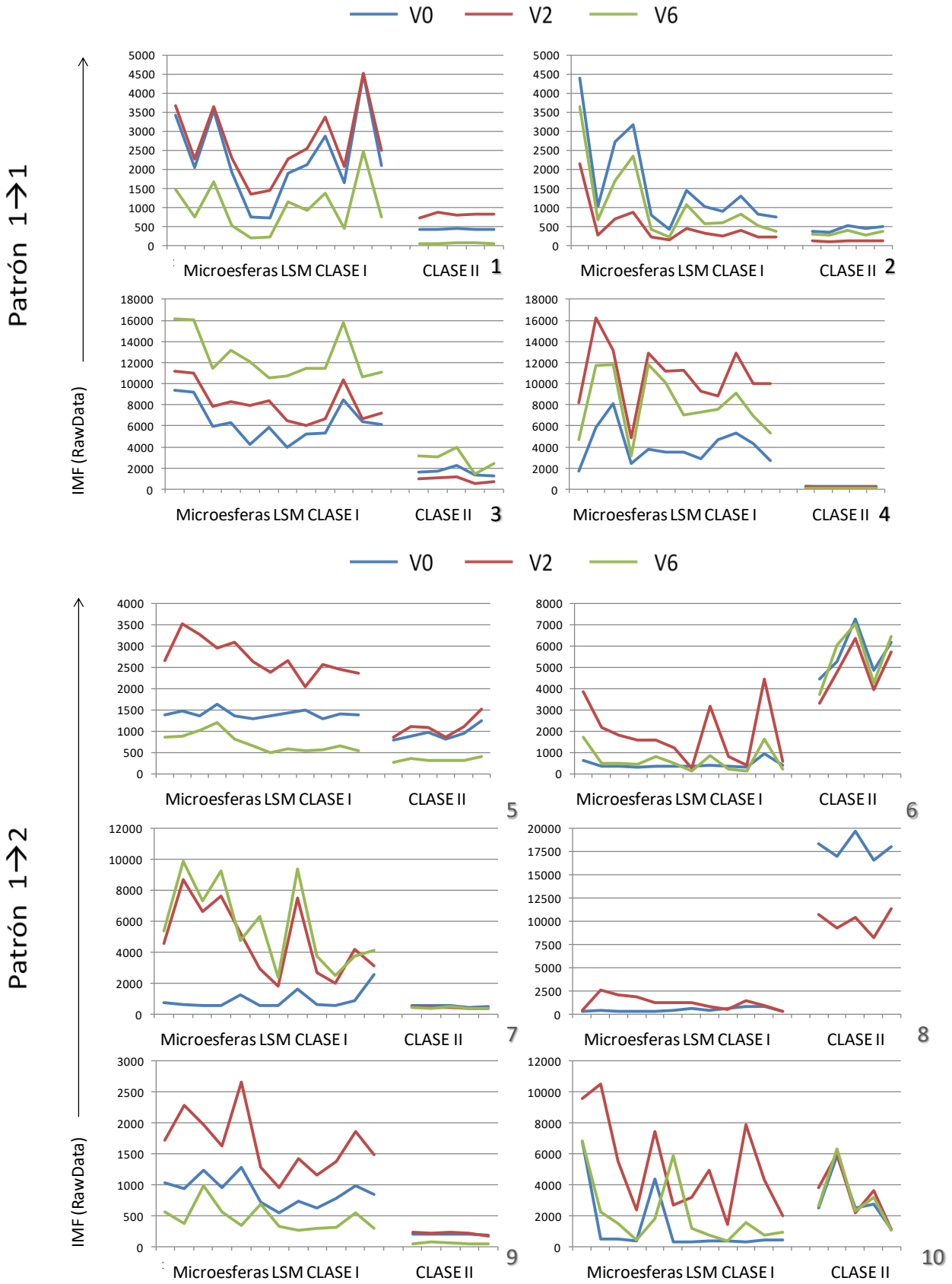


Figura R2: Patrones de respuesta de los 10 pacientes presensibilizados. Patrones superiores: sin cambio en el perfil de especificidades anti-HLA, patrón 1→1. Patrones inferiores: con cambio en el perfil de especificidades, patrón 1→2.

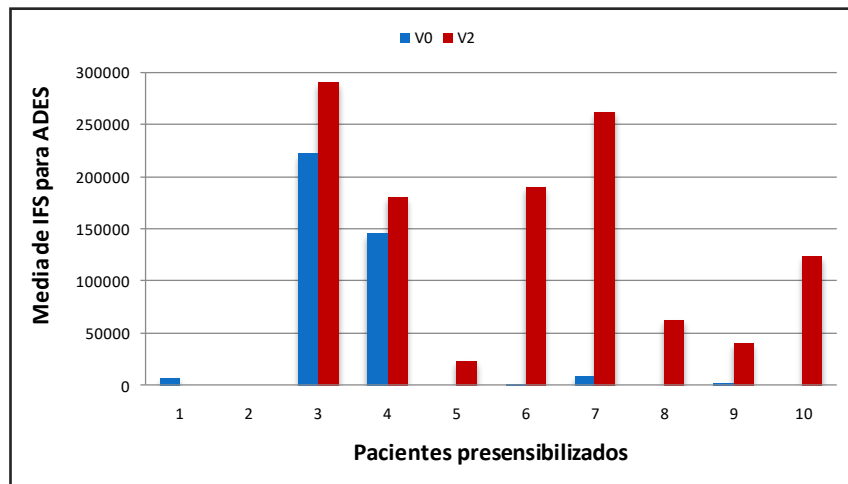


Figura R3: Resultados LSA para clase I de los individuos presensibilizados al inicio del ensayo (V0) y a las 12 semanas (V2). Se valoró la media de las intensidades de fluorescencia estandarizada (IFS) obtenidas solo para los anticuerpos dirigidos contra los antígenos HLA del donante de ASC.

Es decir, la respuesta heterogénea encontrada entre los individuos presensibilizados, se pudo explicar por la presencia o no de ADES al inicio del ensayo. Los pacientes 1 y 2 con patrón $1 \rightarrow 1$ y sin ADES, no respondieron al estímulo alogénico, puesto que no generaron anticuerpos anti-HLA *de novo*, en cambio, los individuos presensibilizados 3 y 4, igualmente con patrón $1 \rightarrow 1$, presentaban ADES al inicio del ensayo, además, con valores altos de IFS (superiores a 10^5 unidades, nuestro límite superior de positividad) y su título aumentó aún más tras el estímulo, es decir, sí hubo un reconocimiento a la administración alogénica de ASC, posiblemente una respuesta de memoria. El resto de pacientes, en su mayoría, no contenían ADES frente a ASC ó los presentaban con valores bajos de IFS (inferiores a 10^5 unidades) y el hecho de que generasen o no una respuesta humoral *de novo* dependió, como se explicará en el capítulo siguiente, de la compatibilidad entre el tipaje HLA del donante de ASC y el del receptor.

4.1.3.-Anticuerpos anti-HLA al año de seguimiento.

Ningún paciente ASC no sensibilizado a los 3 meses presentó anticuerpos anti-HLA al año de seguimiento (Media: $353 \pm 9,5$ días). Tampoco se encontraron nuevos positivos en el grupo placebo. Se puso de manifiesto como al año de la administración alogénica de ASC, los individuos que no presentaron una respuesta humoral en la visita 2, no la generarían con posterioridad. De los 17 pacientes que sí presentaron anticuerpos anti-HLA a los 3 meses del estímulo alogénico, pudieron evaluarse 15 (figura R4). De ellos, 6 negativizaron los anticuerpos anti-HLA (40% de los pacientes naïve a V0), al menos, no se detectaron anticuerpos anti-HLA con ninguna de las técnicas utilizadas y 9 redujeron su título. Entre los 10 individuos presensibilizados, de los que 6 generaron además una respuesta humoral *de novo* tras la administración alogénica de ASC, en sólo 1 (16,6% de los pacientes presensibilizados a V0 y con respuesta *de novo*) no se detectaron

nuevamente los anticuerpos anti-HLA generados, aunque seguía presentando valores similares de aquellos encontrados al inicio de la terapia.

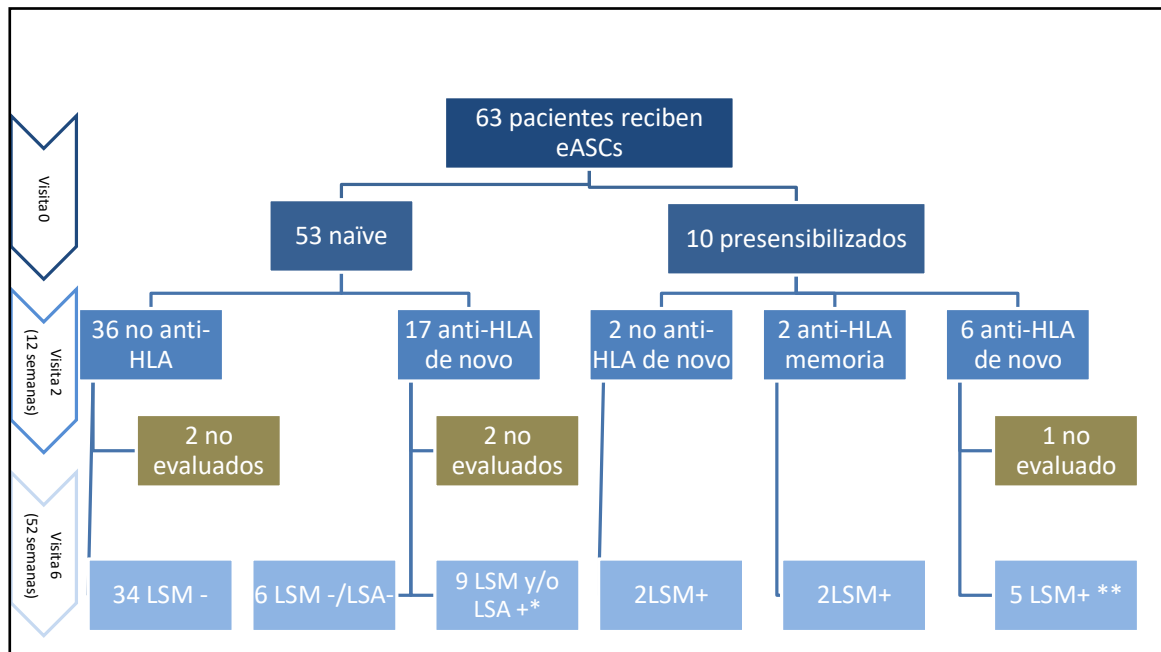


Figura R4: Distribución de resultados del ensayo LSM en cada visita correspondiente. 5 individuos abandonaron el ensayo y no fue posible obtener muestra más allá de los 3 meses. * 4 pacientes con LSM negativo (-) pero con LSA positivo (+). ** 1 paciente había negativizado las especificidades anti-HLA *de novo* encontradas a los 3 meses. LSM: *labscreenMixed*, LSA: *labscreen Single Antigen*

De los diferentes porcentajes de reducción/desaparición de los anticuerpos anti-HLA generados entre los individuos naïve y los individuos presensibilizados, se deduce que hubo una mayor predisposición de los individuos naïve a reducir el título de anticuerpos.

A diferencia de los pacientes que generaban anticuerpos anti-HLA *de novo*, tanto naïve como presensibilizados pero sin ADES, los individuos que sí presentaban ADES generaban una potente respuesta (alto título de anticuerpos anti-HLA) determinada a las 12 semanas, como vimos en el apartado anterior. Al observar esa misma respuesta pero al año de seguimiento en estos pacientes, confirmamos que se mantenía en el tiempo y era superior al inicio de la terapia, es decir, el título de anticuerpos al año de seguimiento fue superior al del tiempo cero, la cinética de respuesta en estos pacientes, por tanto, siguió el mismo perfil que una respuesta inmune secundaria de memoria. Sin embargo, los pacientes presensibilizados pero sin ADES, que generaban nuevos anticuerpos anti-HLA tras el estímulo de las ASC, redujeron el título de sus anticuerpos hasta valores iniciales, lo mismo sucedió con los pacientes naïve que se sensibilizaban. Es decir, la cinética de respuesta en estos pacientes fue similar a una respuesta inmune primaria.

Para ejemplificar este hecho, elaboramos 4 curvas en base a los 4 grupos de pacientes V2 (figura R5): a) pacientes no sensibilizados b) pacientes naïve que generan anti-HLA de novo c) pacientes presensibilizados sin ADES al inicio de la terapia y d) pacientes presensibilizados con ADES al inicio. Se utilizó el sumatorio de todas las fluorescencias de cada microesfera para clase I del ensayo de LSM para representar el título de anticuerpos de cada paciente. El número de pacientes en cada grupo fue limitado y hubiera sido ideal poder contar con muestras recogidas a tiempos anteriores e inmediatamente posteriores a los 3 meses. En una respuesta inmune tras el primer contacto con el alo-antígeno, la detección de anticuerpos a nivel sistémico empieza a producirse al cabo de varios días (de 7 a 21 días), aumenta de forma exponencial hasta llegar a una fase estacionaria tras la cual el título empieza a declinar. Aunque no tenemos la certeza de que los títulos encontrados se correspondan con la fase exponencial, la estacionaria o la fase de aclaramiento, las diferencias encontradas entre los grupos nos dieron una aproximación clara de los dos tipos de respuesta generadas por las ASC.

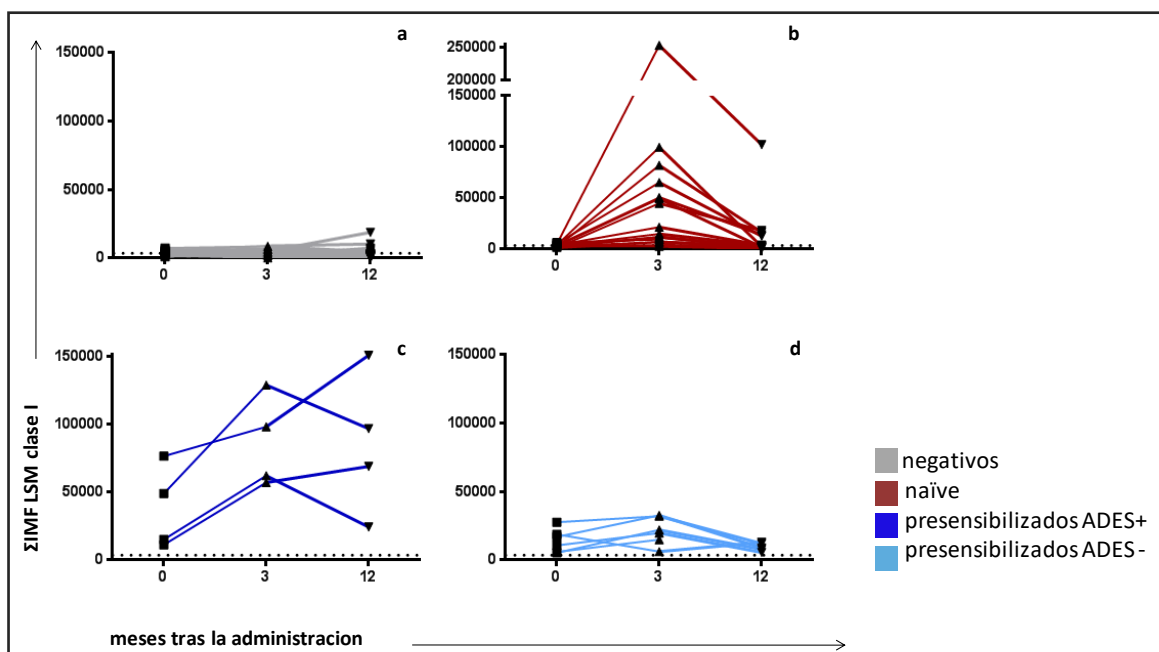


Figura R5: Curvas del título de anticuerpos anti-HLA medido como el sumatorio de las intensidades medias de fluorescencia (Σ IMF) de cada microesfera del LSM para clase I al inicio (0) 3 meses y 12 meses tras la administración. a) pacientes no sensibilizados b) pacientes naïve que generan anti-HLA de novo c) pacientes presensibilizados con ADES al inicio de la terapia y d) pacientes presensibilizados sin ADES al inicio.

Al año de seguimiento, también los patrones de respuesta resultaron útiles para detectar aquellas muestras en las que sería necesario analizar además por LSA a pesar de ser negativas por LSM. Una de las premisas metodológicas fue realizar este ensayo únicamente a las muestras que superaran las 800 unidades de IMF en el ensayo de LSM.

Pero en 4 pacientes de la cohorte ASC, a pesar de que la muestra V6 presentara IMF menores al punto de corte, el patrón de respuesta fue totalmente superponible con el encontrado a los 3 meses (v2), sólo que a mayor escala (figura R6).

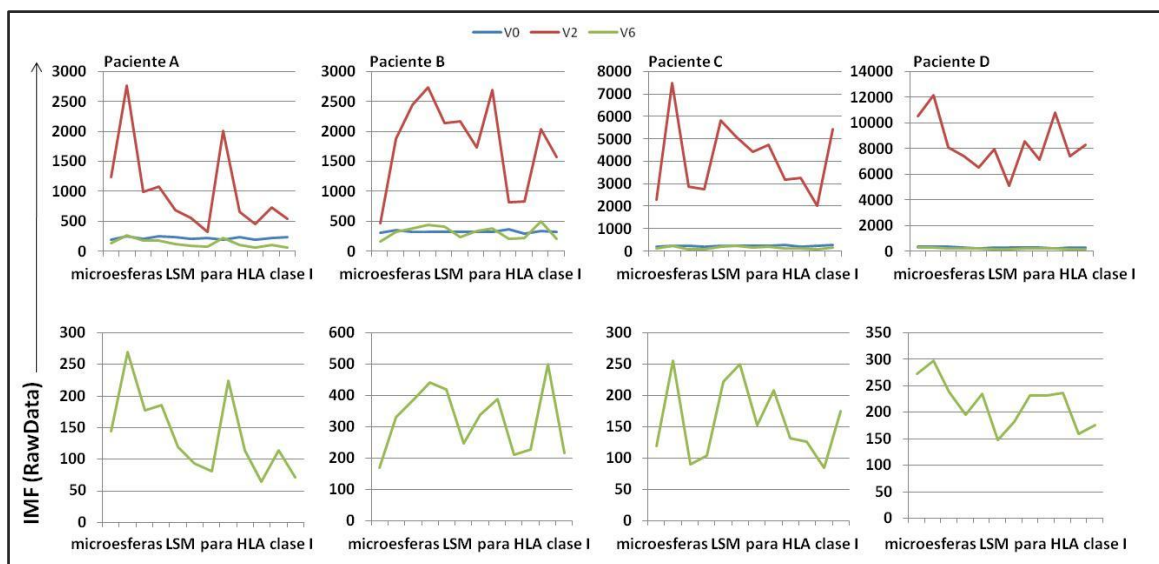


Figura R6: Patrones de respuesta de los 4 pacientes que a pesar de negativizar LSM al año, mantuvieron la misma curva de IMF. El patrón de cada uno de ellos a V2 (rojo) fue superponible con el patrón a V6(verde) representado a mayor escala en la parte inferior de la figura.

Nos decidimos entonces a realizar el ensayo LSA en estas 4 muestras a V6, negativas por LSM y revelaron las mismas especificidades que las encontradas a V2, aunque con menor intensidad, pero igualmente positivas, pues superaban las 10000 unidades de IFS (Tabla R5).

Microesfera	Alelo	Paciente A		Paciente B		Paciente C		Paciente D	
		V2	V6	V2	V0	V2	V6	V2	V6
4	A*02:01	0	0	144032,42	32234,16	236682,77	6866,29	335902,84	10046,93
5	A*02:03	0	0	143704,5	34465,16	221552,02	7449,42	280857,91	4152,83
6	A*02:06	0	0	145168,36	25743,76	239178,66	3253,34	322558,88	2670,06
10	A*23:01	146766,72	5154,02	67584,14	14263,5	103727,16	0	184246,31	0
11	A*24:02	152587,11	5092,92	62285,52	11156,19	2122,98	0	196938,06	269,1
12	A*24:03	96895,02	169,13	60095,73	16690,98	10344,93	0	183668,95	549,29
40	B*15:01	277975,06	13846,39	5730,48	0	362811,28	39742,71	361126,75	10668,08
63	B*49:01	320905,69	19312,59	52200,65	9818,38	408546,94	43560,99	379549,44	6842,31
83	C*03:02	6679,35	0	0	0	99284,58	13719,18	155692,5	0
89	C*07:02	1057,26	0	0	0	13883,71	8690,13	96051,85	0

Tabla R5: Listado de intensidades de fluorescencia estandarizada (IFS) en el ensayo LSA de clase I (LSA-1, lote 9, One Lambda™), para cada uno de los 4 pacientes con LSM negativo en la V6 pero con patrón mantenido desde la V2. Se representan los alelos relacionados con el tipaje del donante de ASC.

4.2.-RECONOMIENTO *IN VITRO* DE ASC POR ANTICUERPOS ANTI-HLA

4.2.1.-Expresión de HLA en ASC

Uno de nuestros objetivos, era conocer si las ASC eran capaces de fijar anticuerpos anti-HLA, para ello primeramente evaluamos la unión directa de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a antígenos HLA en la membrana de ASC a través de un análisis semicuantitativo por citometría de flujo. Se utilizaron para ello concentraciones crecientes de anticuerpos dirigidos frente a moléculas HLA de clase I y HLA de clase II (clones W6/32 y L243 respectivamente, que reconocen específicamente las regiones conservadas de ambas moléculas) frente a una concentración de 50000ASC/100ul y evaluamos las IMF que se conseguían en cada punto (figura R6). De la misma forma comprobamos la capacidad de unión al preactivar las ASC con IFN γ .

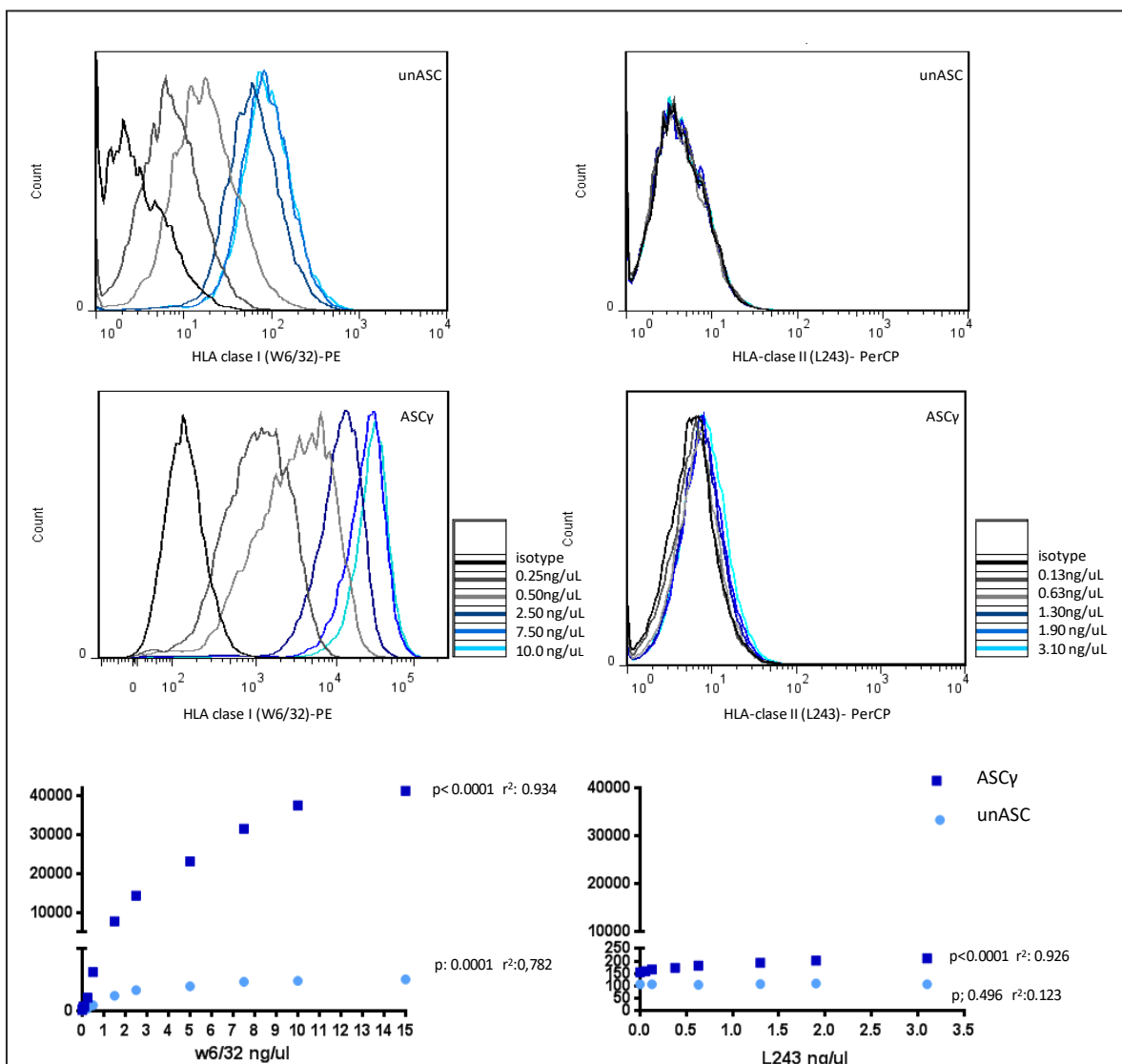


Figura R6: Expresión de HLA clase I (W6/32-PE) y clase II (L243-PerCP) en ASC en estado basal (unASC) y estimuladas con IFN γ (ASC γ). Se representan los histogramas y las curvas de saturación para las IMF obtenidas con cada concentración de anticuerpo utilizada. Para cada una se muestra la recta de regresión con la correlación y la significación obtenida en cada caso.

Los resultados obtenidos fueron concordantes con lo descrito en la bibliografía de ASC donde el grado de expresión de HLA para clase I en condiciones basales es bajo, pero aumenta cuando las ASC fueron preactivadas con IFN γ (figura R6). Sin embargo, la expresión de moléculas de HLA de clase II, en condiciones basales es nula, no así si las ASC estaban preactivadas, aunque a niveles muy bajos (Puissant,2005; delaRosa 2009). Dados los resultados, la unión antígeno-anticuerpo en el caso de HLA de clase I fue dosis dependiente con una r^2 de 0,78 y 0,93 en las curvas correspondientes a cada condición, basal y estimuladas respectivamente. La concentración saturante se consiguió con 10ng/ul de W6/32 (figura R16), donde la expresión de HLA de clase I en membrana fue 15 veces superior al preactivar las ASC con IFN γ respecto al estado basal. Sin embargo, en la detección de antígenos HLA de clase II en estado basal, no obtuvimos ninguna señal y no pudo ajustarse ninguna curva, pero preactivando las ASC con IFN γ , una concentración de 3,1ng/ul de L243 fue suficiente para alcanzar el punto de saturación. La IMF obtenida en este punto apenas duplicaba la señal con el control de isotipo, la correlación sin embargo, mostraba una unión antígeno-anticuerpo dosis-dependiente. Es decir, las ASC sólo expresan antígenos HLA de clase II en membrana tras ser preactivadas con IFN γ y en niveles muy bajos como demostramos con la baja concentración saturante del anticuerpo L243.

4.2.2.- Detección de la fijación de anticuerpos anti-HLA sobre las ASC:

Una vez fijadas las condiciones óptimas para ensayar por citometría de flujo la fijación de anticuerpos anti-HLA, se testaron todas las muestras obtenidas a los 3 meses post-administración (V2), tanto de los pacientes que habían sido positivos por LSM como los que tuvieron un resultado negativo. Para ello se incubaron 50000ASC/100ul con 50ul de plasma V2 y se reveló la fijación de anticuerpos con anti-IgG humana marcada con FITC. Se comprobó el incremento de IMF al sustraer para cada muestra el IMF obtenido con el control negativo (ASC incubada con "pull" sueros donantes sanos no aoinmunizados más anti-IgG humana-FITC). Como se muestra en la figura R7, sólo se encontró un incremento de IMF significativo en los pacientes positivos por Luminex. Al igual que ocurría con el anticuerpo W6/32, este incremento fue mucho mayor cuando las células habían sido previamente estimuladas con IFN γ .

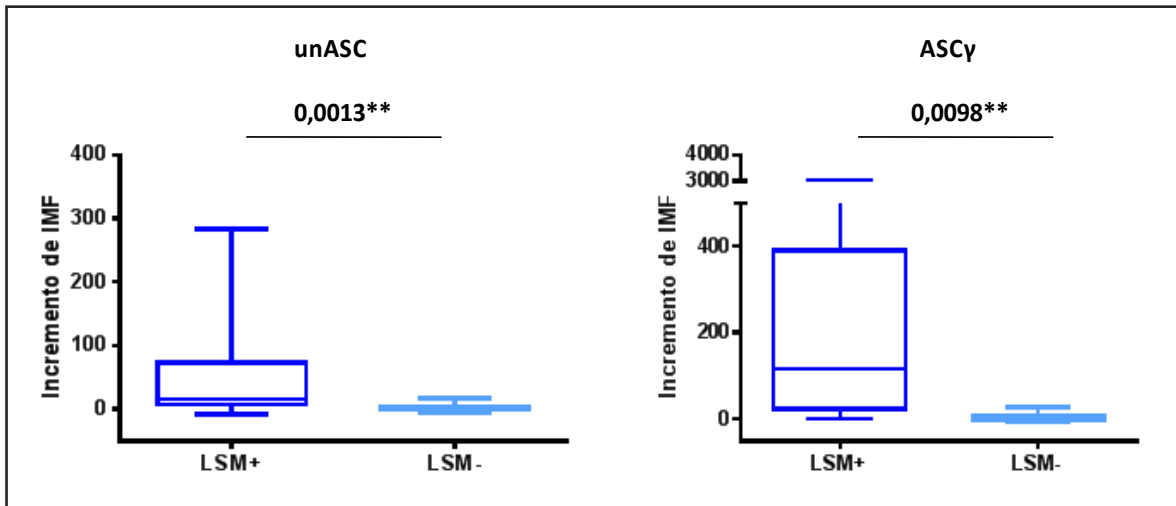


Figura R7: Resultados de FCXM (prueba cruzada por citometría de flujo convencional) para cada una de las muestras a V2 de los pacientes que recibieron el tratamiento con ASC. El ensayo se realizó con ASC en estado basal (unASC) y preactivadas con IFN γ (ASCy).

Una vez comprobado que sólo los pacientes que presentaban ADES fijaban anti-IgG humana sobre las ASC, se quiso determinar el rendimiento diagnóstico de la FCXM con independencia del ensayo multiplex. Para ello se elaboraron curvas ROC con los resultados en condiciones basales y ASC preactivadas, a fin de conocer cuál de las dos condiciones resulta más óptima para discriminar a los pacientes negativos de los positivos (figura R8). El resultado que obtuvimos nos proporcionó un valor de área bajo la curva (AUC) próximo a 1 en ambas condiciones, lo que nos indica que el FCXM es una buena técnica para distinguir pacientes con o sin anticuerpos anti-HLA utilizando ASC con o sin preactivar.

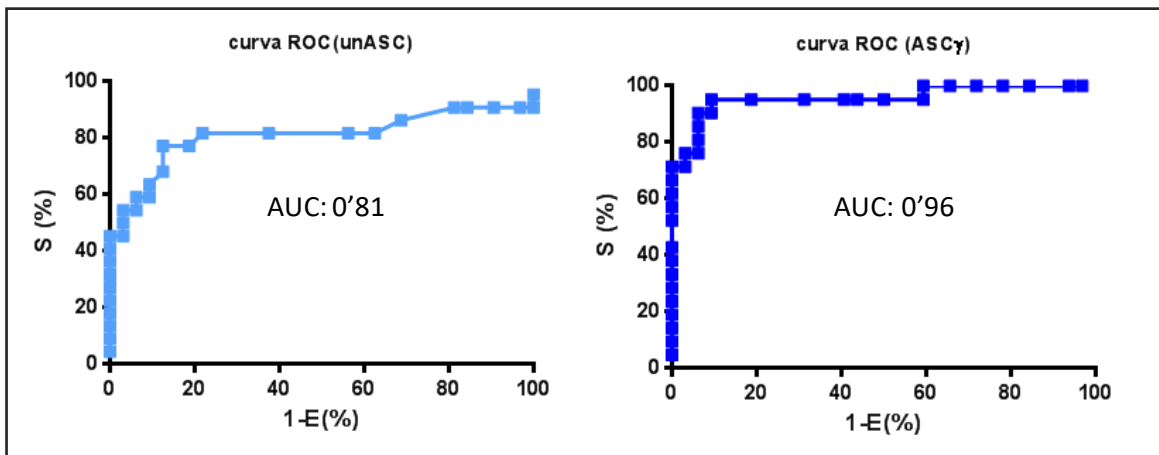


Figura R8: Análisis por curvas ROC del ensayo FCXM, es una buena técnica para discriminar aquellos individuos con ADES, tanto en condiciones basales (izquierda, unASC) como con ASC preactivadas (derecha, ASCy). Aunque con ASCy se consigue un mejor rendimiento diagnóstico. AUC: área bajo la curva

No obstante, de las dos condiciones, el FCXM con ASCy, resultó la mejor opción para discriminar con mayor especificidad y sensibilidad los pacientes con o sin anticuerpos. De entre todos los puntos utilizados en el análisis por curvas ROC al utilizar ASCy (con mayor expresión de HLA de clase I en membrana), un incremento de IMF superior a 15 unidades de fluorescencia, era suficiente para distinguir una sensibilización y fue elegido como punto de corte (figura R9) para discriminar a los individuos positivos de aquellos pacientes sin ADES.

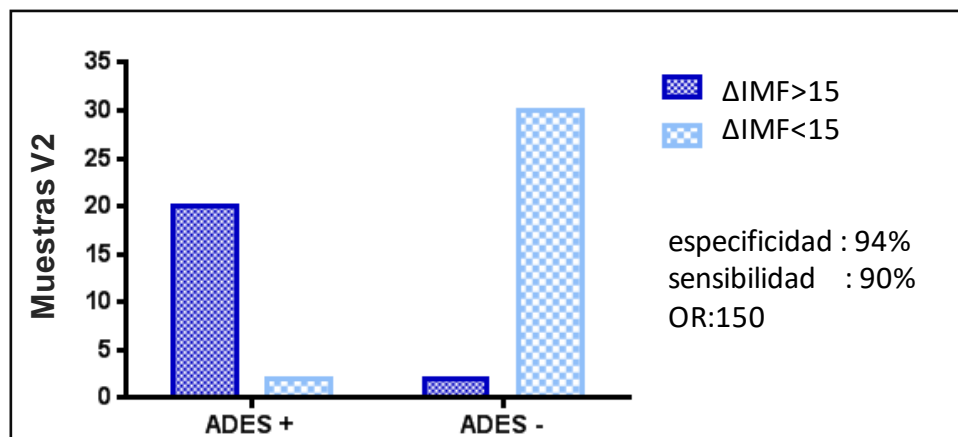


Figura R9: distribución de resultados positivos (azul oscuro) o negativos (azul claro) por FCXM para ASC estimuladas aplicando la premisa de un incremento de IMF de 15 unidades en base a la presencia o no de anticuerpos anti-HLA por el ensayo LSM.

Al clasificar de nuevo a los pacientes en base a este punto de corte y comparando los resultados con su positividad por Luminex, comprobamos por análisis de contingencia cómo efectivamente la FCXM es igualmente válida para discriminar a aquellos pacientes que han generado anticuerpos anti-HLA tras una administración alogénica de ASC con una Odds Ratio (OR) de 150 y una especificidad y sensibilidad del 94% y 90%, respectivamente.

4.2.3.-Reconocimiento de las ASC por los anticuerpos anti-HLA preexistentes

Las muestras analizadas a V0, previas a la administración de ASC revelaron 10 pacientes que presentaban anticuerpos anti-HLA de clase I con diferentes especificidades por análisis multiplex, algunas de ellas, resultaron específicas para el donante de ASC y con distinta intensidad. Desconocíamos el estímulo alogénico que los generó y por ello se comprobó si eran capaces de reconocer los antígenos HLA presentes en la membrana de las ASC *in vitro*, utilizando igualmente las mismas condiciones de la prueba FCXM. En paralelo, se analizaron las muestras de los mismos pacientes pero a V2 (Figura R10).

Al analizar los resultados, en condiciones basales de expresión de HLA, comprobamos como los 2 pacientes con mayor puntuación de ADES, fueron claramente positivos

(figura R10). Al pre-activar las ASC con $IFN\gamma$, estos dos pacientes seguían siendo positivos, aumentado el ΔIMF con respecto a la primera condición (a mayor HLA en membrana, mayor detección de anti-IgG humana). Sin embargo, otros pacientes con menor título de anticuerpos, a pesar de presentar ADES no alcanzaban el nivel mínimo de positividad.

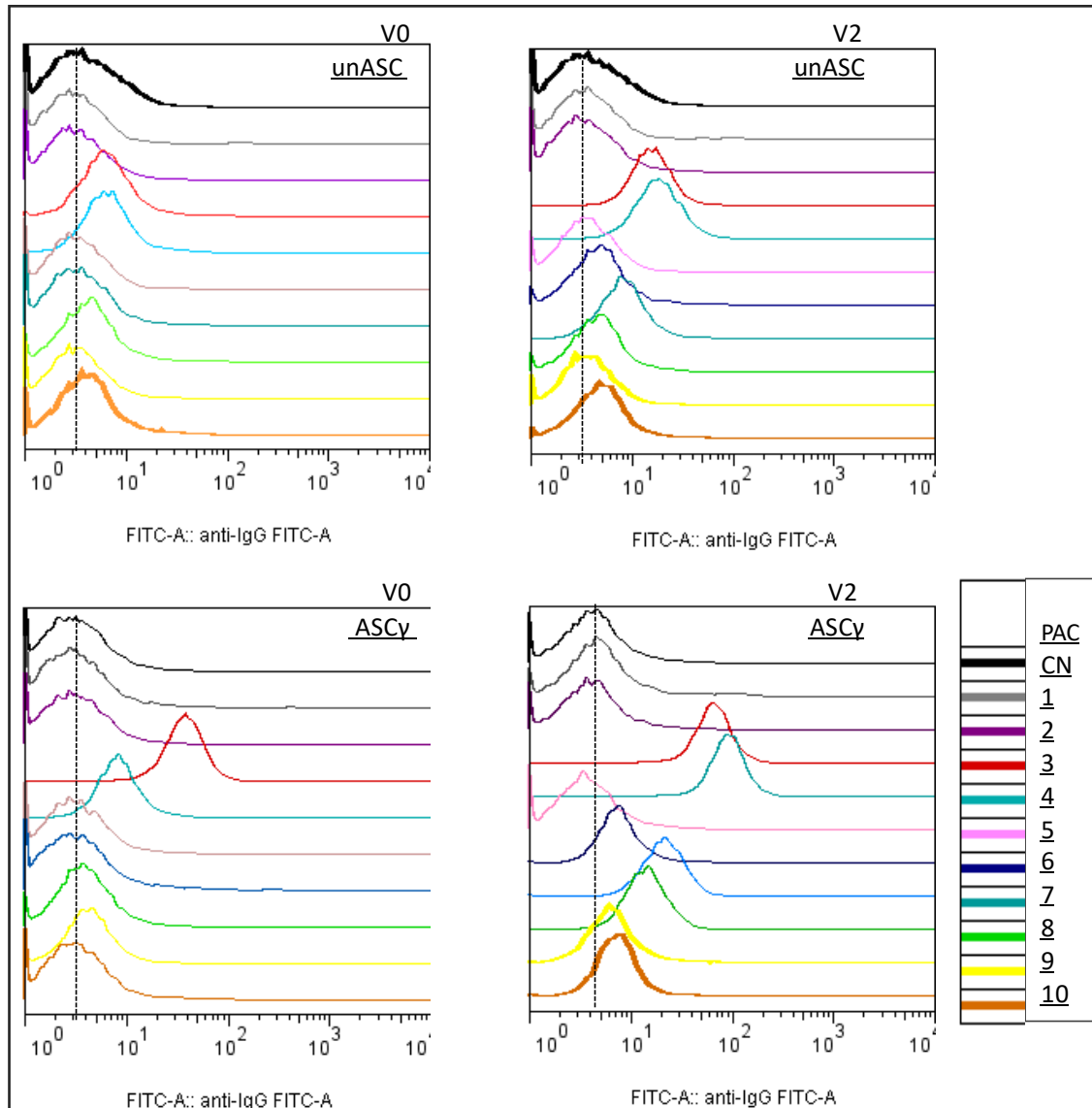


Figura R10: Histogramas de las FCXM en los individuos presensibilizados de la cohorte de pacientes ASC, en condiciones basales (superior) y preactivadas (inferior) para V0 y V2. Sólo los pacientes 3 y 4 mostraron una clara positividad en ambas condiciones. Se representa el CN y el punto de corte (línea de puntos).

Observamos también cómo otros pacientes, como el paciente 1, en los que existe un título de anticuerpos alto, con un valor de cPRA alto (tabla R6), por la prueba de FCXM resultaron negativos, ya que no presentaban ADES contra el donante de ASC. Estos resultados nos permitieron deducir que el reconocimiento *in vitro* de las ASC depende de la cantidad de anticuerpos anti-HLA presentes en plasma pero que también es específico. Resultados que son compatibles con las pruebas cruzadas por citometría de

flujo llevadas a cabo entre sueros de receptores y linfocitos de donantes en el trasplante de órgano sólido (Lentine, 2008). Es decir, sólo aquellas muestras con un título alto de anticuerpos anti-HLA y que además sean donante específicos resultarán positivas por FCXM.

Paciente	(ADES)				Puntuación establecida	cPRA Eurotransplant reference	ΣIMF LSM-I(v0)	ΔIMF FCXM unASC	ΔIMF FCXM ASCy
	>10 ⁵ (8)	IFS >4x10 ⁴ (6)	>2x10 ⁴ (4)	>10 ⁴ (2)					
1	--	--	--	--	0	80,2	27636,57	-9	-2
2	--	--	--	--	0	13	18841,6	-9	-3
3	A*02, B*49, B*15:01	--	--	C*03	26	96,8	48980,93	69	142
4	A*02, B*15:01, B*49, C*07	--	--	C*03	34	90,3	76471,39	64	902
5	--	--	--	--	0	6,8	16966,16	-4	3
6	--	--	--	--	0	23	5339,89	---	---
7	--	A*24	--	--	6	25,3	11281,94	-4	-1
8	--	--	--	--	0	0	10720,85	0	37
9	--	--	--	--	0	0	5918	11	25
10	--	C*07	--	--	6	28,3	15197,29	5	5

Tabla R6: Resultados de FCXM de las muestras a V0 en los individuos presensibilizados. Se representan la presencia de ADES y su puntuación, además de su cPRA (anticuerpos reactivos contra el panel, calculado sobre la base de datos de Eurotransplant). Para cada uno de ellos se recoge la información del ΣIMF del ensayo LSM referentes a clase I y el incremento de IMF obtenido con la prueba de FCXM.

En definitiva, el hecho de que un paciente presensibilizado presente un FCXM positivo frente a las ASC previo a su administración indica que contiene ADES y además con una alta puntuación (según los criterios establecidos para cada nivel de fluorescencia).

4.3.-RELACIÓN DE LOS DATOS DE FCXM CON EL ENSAYO MULTIPLEX

Existe una fuerte correlación entre la detección de anticuerpos anti-HLA específicos por Luminex y por citometría de flujo convencional (Moreno, 2012), no obstante, estos estudios han sido evaluados utilizando linfocitos de donantes. Para conocer el grado de correlación entre las dos técnicas utilizando ASC, comparamos las IMF conseguidas en la FCXM con el sumatorio de las IMF obtenidas para cada microesfera de clase I en el ensayo de LSM para los pacientes ADES+. El resultado confirmó que existe una regresión lineal con significación positiva y un grado de correlación en torno al 90% (r^2 : 0,92 y r^2 : 0,85, con unASC y ASCy, respectivamente)(figura R11,izquierda), es decir, los pacientes con menores IMF por Luminex tenían un incremento de IMF por FCXM también menor y por el contrario con los sumatorios de IMF más altos por Luminex se obtenían los mayores incrementos de fluorescencia por FCXM, es decir, fijaban más inmunoglobulina sobre las ASC y esto ocurría en las dos condiciones estudiadas. La correlación y

significación se mantuvieron al eliminar los puntos extremos (r^2 : 0,83 y r^2 : 0,69, con unASC y ASC γ , respectivamente figura no mostrada).

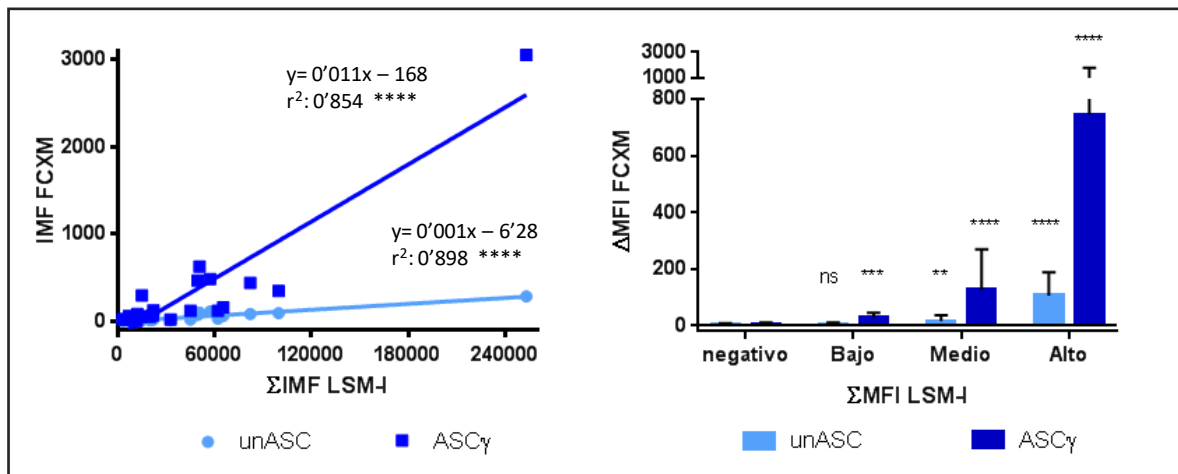


Figura R11: Correlación entre las técnicas de detección de anticuerpos anti-HLA, citometría de flujo y Luminex para las muestras V2. Izquierda, se representan las rectas de regresión lineal, coeficiente de correlación (r^2) y significación. Derecha: Significación por t-Student de pacientes en base a su título de anticuerpos con respecto a los pacientes negativos por Luminex y su correspondiente resultado por FCXM en condiciones basales (unASC) y preactivadas (ASC γ). IMF FCXM: intensidad media de fluorescencia en prueba cruzada por citometría de flujo. ΣIMF LSM-I: Sumatorio de intensidades media de fluorescencia de las microesferas para clase I del ensayo LSM. Ns: no significativo, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

Además, se dividieron las muestras correspondientes a los 3 meses post-administración (V2) de los pacientes en base a los resultados obtenidos por LSM para los ΣIMF de clase I en: negativos (ningún bead superaba los 800ua), bajo ΣIMF (ΣIMF inferiores a 10000), medio ΣIMF (ΣIMF comprendidos entre 10000 y 50000ua) y pacientes con altos ΣIMF (ΣIMF mayores de 50000ua). Al comparar en cada grupo las IMF obtenidas con el ensayo FCXM con respecto al grupo negativo (figura R11, derecha), se dedujo que aquellos pacientes con valores bajos de fluorescencia por Luminex, sólo tendrían posibilidad de ser positivos por FCXM al testarlos frente a células estimuladas, pues las IMF que se consiguieron por FCXM en estos pacientes en condiciones basales no mostraban diferencias significativas con los pacientes negativos. Para los pacientes con valores de IMF intermedias por tecnología multiplex, ya en condiciones basales sí que se diferenciaban de forma significativa de los pacientes negativos, y por supuesto frente a ASC estimuladas, al igual que los pacientes con valores altos de fluorescencia en ambas condiciones.

Los resultados avalaron por tanto la correspondencia de las dos técnicas utilizando ASC en lugar de linfocitos. La tecnología Luminex no obstante, ofrece una mayor sensibilidad. Al igual que en el trasplante de órgano sólido, habría que determinar la relevancia clínica de las especificidades encontradas con bajo nivel de fluorescencia por

el ensayo multiplex pero que resultan negativas en el reconocimiento de su antígeno *in vitro*.

Por último, quisimos comprobar la correspondencia entre las dos técnicas a nivel de locus HLA, es decir, cuál de los locus de clase I expresados en la membrana de las ASC (HLA-A, HLA-B o HLA-C) se correspondía mejor con las especificidades de anticuerpos encontrados en los 23 pacientes positivos por tecnología Luminex a V2. Para ello elaboramos nubes de puntos con los sumatorios de IFS de las microesferas del ensayo LSA por cada locus en cada paciente, con el Δ IMF obtenido por FCXM de las muestras a V2 (Figura R12) y comprobamos la correlación existente, tanto con ASC basales como pre-activadas con IFN γ .

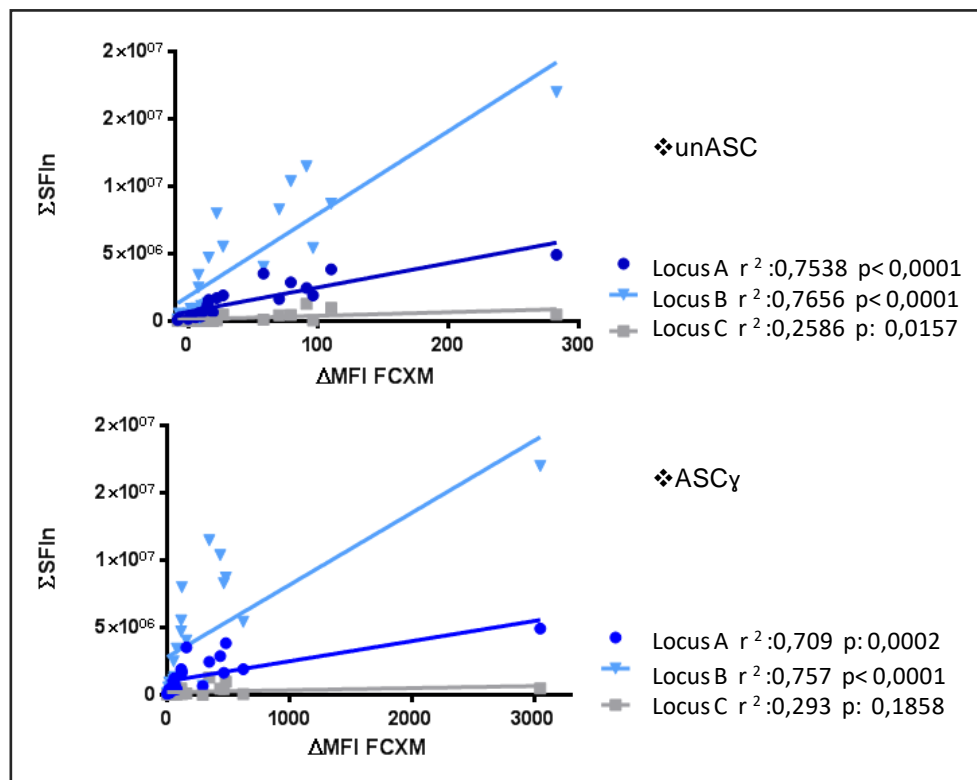


Figura R12: Relación entre los niveles de fluorescencia de anticuerpos anti-HLA de cada locus de clase I obtenidos por Luminex con los resultados de citometría de flujo para las 23 muestras ADES+ a los 3 meses post-administración. Para cada caso y en cada situación se representa el coeficiente de correlación (r^2) y la significación obtenida. Σ IFS n LSA: Sumatorio de las intensidades de fluorescencia estandarizada de las microesferas del ensayo "Labscreen single antigen" de cada locus HLA. Δ IMF FCXM: Incremento de fluorescencia con respecto a control negativo en prueba cruzada por citometría de flujo.

La correspondencia se consiguió de forma muy significativa para los locus A y B, en las dos condiciones estudiadas, obteniendo coeficientes de correlación superiores al 70%. Sin embargo, para el locus C, la correlación no resultó tan buena (alrededor del 25%). En cualquier caso, la detección de anticuerpos anti-HLA por citometría de flujo también se corresponde con el ensayo LSA y aquellos pacientes con un valor alto de IFS en las especificidades anti-HLA-A o anti-HLA-B resultarán probablemente positivos por FCXM.

4.4.-CAPACIDAD CITOTÓXICA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-HLA SOBRE LAS ASC

Se desconoce si los anticuerpos anti-HLA generados tras una administración alogénica de ASC fijan complemento y son precipitantes de una lisis celular. Para ello, se puso a punto previamente, el ensayo de citotoxicidad dependiente de complemento por citometría de flujo (FCtox) analizando la expresión de 7AAD tras incubar las células mesenquimales ASC con muestras de pacientes hiperinmunizados incluidos en lista de espera de trasplante renal, descrito por Won y col. en 2006 sobre linfocitos de donantes y más tarde también por Alheim y col. en 2013 que comparó los resultados además con el ensayo C1q disponible en plataforma Luminex. Durante este proceso, ya observamos como con las condiciones que establecimos sólo era posible obtener un porcentaje de células ASC 7AAD+ cuando estas estaban estimuladas con IFN γ , y aún así, solo con el *pull* de sueros de hiperinmunizados con mayor título, *pull* AH (Σ IMF LSM-I: 213376 unidades), conseguíamos apenas un 20% de mortalidad. Con estos antecedentes, no pudimos establecer en una correlación entre las IMF de fijación de Inmunoglobulina G y el porcentaje de células 7AAD+, pues no conseguimos una mortalidad clara en casi ninguna de las muestras.

Sin embargo, para uno de los pacientes que generaban anticuerpos anti-HLA, se encontró un porcentaje de células 7AAD+ cercano al 40% en condiciones de activación (figura R13). Este paciente, mostraba un título de anticuerpos en la muestra a 3 meses superior a nuestro control positivo (Σ IMF LSM-I: 253222.49).

Este paciente, era un individuo naïve que generó anticuerpos anti-HLA sólo de clase I tras la administración alogénica de ASC, su tratamiento concomitante fue anti-TNF y el grado de incompatibilidad con el donante de ASC fue de 37 epletos diferentes, el mayor encontrado en la cohorte ASC. Además, presento el título de anticuerpos anti-HLA encontrados a 3 meses más alto y con el mayor incremento de IMF en el ensayo de FCXM en ambas condiciones entre los individuos naïve.

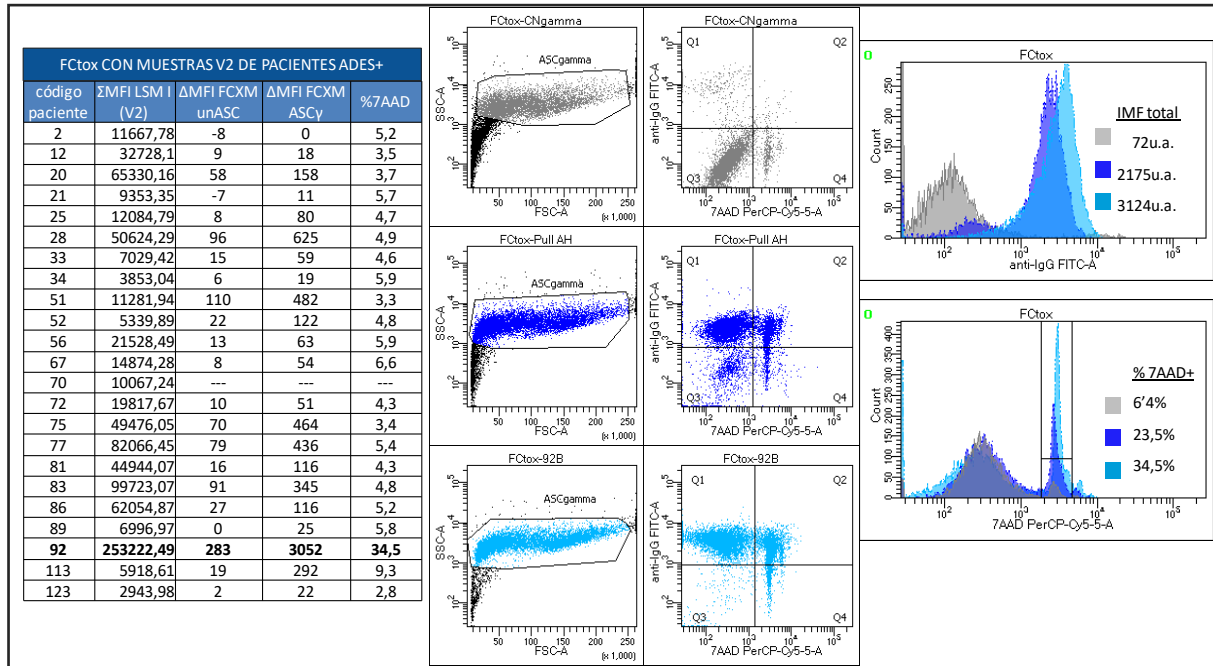


Figura R13: Citotoxicidad dependiente de complemento por citometría de flujo (Fctox) de la cohorte ASC. Se representan las imágenes de citometría para el único paciente (92B) que presentó un resultado positivo con respecto al control negativo (CN) y comparado con el *pull* de sueros de pacientes hiperinmunizados (*pull* AH) tan solo frente a ASC preactivadas.

En cualquier caso, los resultados obtenidos con el ensayo Fctox nos indicaron que los anticuerpos anti-HLA generados si se fijan a los antígenos de ASC en conformación nativa. Pero no son concluyentes para conocer si son citotóxicos o las ASC tienen mecanismos de resistencia a lisis por complemento. Sin embargo, nos permiten deducir que sólo aquellos sueros con un título de anticuerpos anti-HLA muy alto serían capaces de conseguir una citotoxicidad dependiente de complemento.

4.5.-FACTORES CONDICIONANTES EN LA GENERACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-HLA

4.5.1.-Diferencias antigénicas entre el tipaje HLA del donante ASC y cada paciente.

Existen en la literatura, multitud de estudios acerca de la correlación existente entre las diferencias antigénicas entre los tipajes HLA de donante y receptor y la probabilidad de producir anticuerpos (Dankers, 2004; Williams 2017). Nuestro propósito fue comprobar si la producción de anticuerpos anti-HLA en la administración local de ASC alogénicas también se correlacionaba directamente con el grado de incompatibilidad entre tipajes (medido a nivel de *eplets*, es decir, tomando a cada alelo HLA de cada receptor como una

cadena de residuos polimórficos, alineándolos con cada alelo HLA del donante ASC y comprobando sus diferencias).

Para esta tarea, el algoritmo HLA Matchmaker (Duquesnoy, 2002) resultó fundamental, aunque en este caso nuestra n fue limitada, pero para todos los pacientes obtuvimos un número de *ep/ets* incompatibles, es decir, residuos polimórficos que se encontraban en el repertorio HLA del donante pero no en el receptor y que por tanto podían desencadenar un reconocimiento alogénico. Dado que los anticuerpos sólo se dirigían frente a HLA de clase I, tuvimos en cuenta sólo las diferencias antigénicas para clase I (locus HLA-A, B, C) y cómo las especificidades encontradas, al igual que la relación con la FCXM, se dirigían fundamentalmente frente a los locus A y B, corroboramos la relación sólo teniendo en cuenta los dos locus. Al agrupar a todos los pacientes en cada rango de *ep/ets* incompatibles, se calculó el porcentaje de individuos en cada rango que habrían generado anticuerpos anti-HLA y se determinó la correlación de ambos parámetros (figura R14A). De la misma forma, se comparó la relación de incompatibilidades con el grado de eficacia o respuesta clínica recogida en la semana 12 de evaluación (figura R14B).

En cuanto a la probabilidad de presentar anticuerpos anti-HLA frente a las ASC, se determinó una relación lineal directa entre el porcentaje de individuos que los generaban y el número de incompatibilidades entre tipajes con una correlación significativa en los locus HLA-A y HLA-B ($p:0,014$). Dados estos resultados, la probabilidad de generar anticuerpos anti-HLA tras una administración alogénica de ASC sería mayor cuantas más diferencias antigénicas hubiera entre el tipaje del donante de ASC y el receptor, con mayor relevancia para los locus A y B. No así, si tenemos en cuenta las incompatibilidades a nivel de los 3 locus, aunque como hemos visto en los dos capítulos anteriores, las especificidades anti-HLA encontradas y la relevancia en la positividad para FCXM recae mayoritariamente frente a locus A y B.

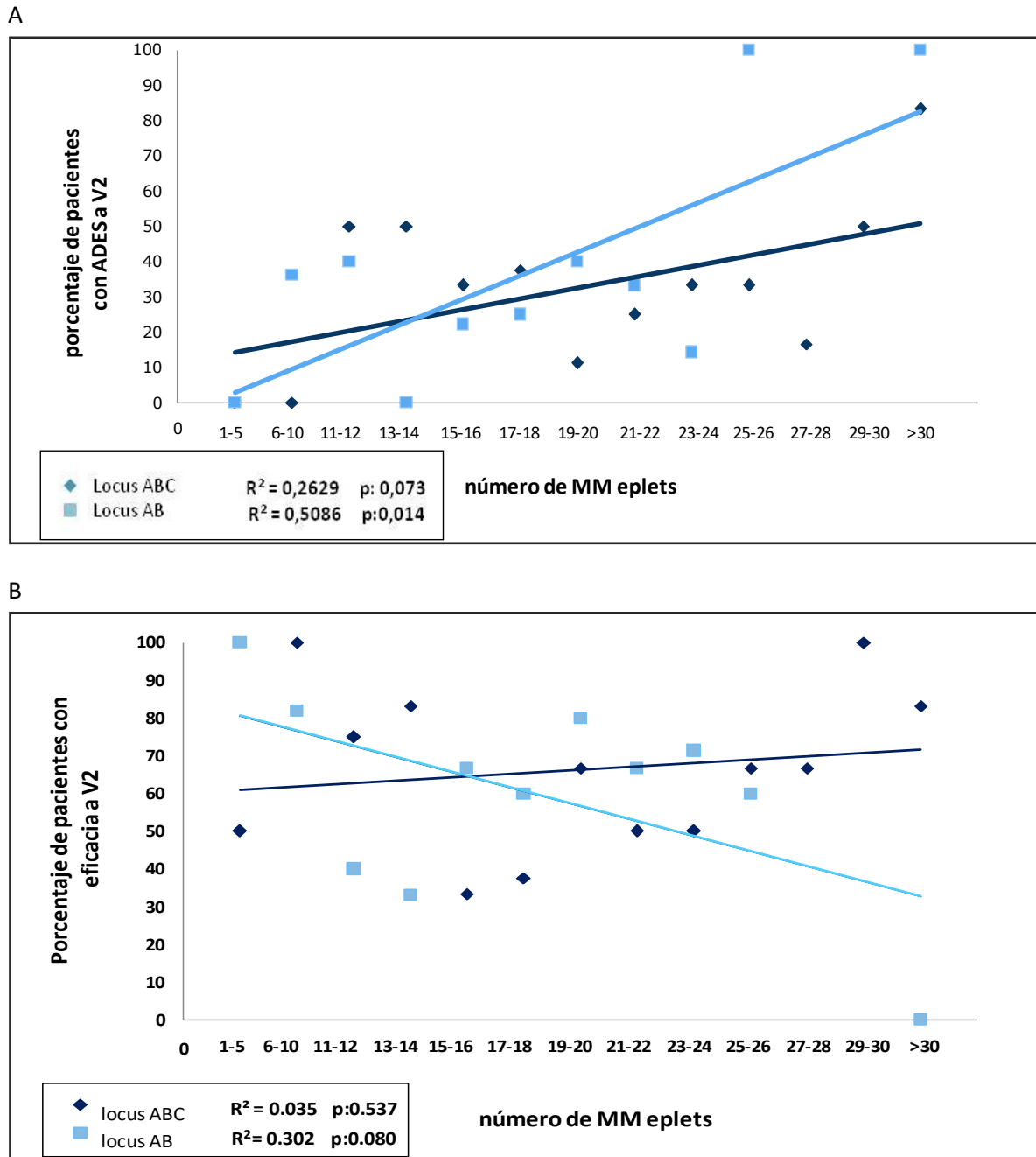


Figura R14: Correlación de la incompatibilidad HLA a nivel de *eplets* entre donante de ASC y paciente con la generación de ADES (A) y la eficacia clínica conseguida (B) a V2. Se representan el número de MM (mismatched, incompatibilidades en inglés) eplets para los locus A, B, C (azul oscuro) ó sólo para locus A y B (azul claro). Para cada recta de regresión se muestra el coeficiente de determinación (R^2) y la significación al aplicar el test de correlación de Pearson.

Al comprobar igualmente si el grado de incompatibilidad HLA se relacionaba con una respuesta favorable al tratamiento, es decir, el número de pacientes en cada nivel que conseguían un cierre de fístulas a la semana 12 de seguimiento, encontramos una paridad de respuesta a todos los niveles sin ningún tipo de tendencia y con valores del coeficiente de determinación por debajo del 50%, en base a estos resultados no existió

una relación entre el grado de incompatibilidad HLA y la eficacia en el tratamiento con alo-ASC. No obstante, el número de pacientes en cada rango de *MM eplets* es muy limitado y necesitaría una confirmación con cohortes más amplias.

4.5.2.-Tratamiento concomitante al inicio del ensayo.

Según el protocolo de inclusión en el ensayo clínico, los pacientes elegidos tenían que ser refractarios a por lo menos uno de los siguientes tratamientos: a antibióticos, ciprofloxacina ó metronidazol (refractarios definidos como no respuesta después de 1 mes), a inmunomoduladores, azatioprina, 6-mercaptopurina ó metotrexato (refractarios definido como no respuesta después de 3 meses), ó a tratamientos anti-TNF de inducción o mantenimiento. Se excluyeron los pacientes que no habían recibido tratamiento previo de enfermedad de Crohn perianal y aquellos que se sometieron a una cirugía previa para la fase activa distinta del drenaje o la colocación de setón. Tampoco se incluyeron pacientes que hubiesen recibido corticosteroides en las 4 semanas anteriores.

A los pacientes incluidos se les mantuvo de forma concomitante su terapia anterior (anti-TNF, inmunomodulador, ambos o ninguno) y utilizando una lista de asignación al azar preestablecida, generada por el Departamento de Bioestadística de Linical (Madrid, España) fueron randomizados a un brazo (tratamiento activo) u otro (placebo) de acuerdo al ensayo clínico a doble ciego. (Panés y col, 2016).

Sólo un 15,8% (3 de 19) de los pacientes que tomaban anti-TNF más inmunosupresores junto con la administración de ASC, generaron anticuerpos anti-HLA ASC específicos (ADES+). Mientras los pacientes sin ningún tratamiento concomitante, ó que tomaron sólo anti-TNF ó sólo inmunosupresores los generaron en un 46,2%, 43% y 71,5% de los casos, respectivamente (Figura R15). Estos resultados fueron significativos al aplicar el test de χ^2 con 3 grados de libertad (χ^2 :7,89; p-valor: 0,048), hecho que es indicativo de que el tipo de tratamiento concomitante podría condicionar la producción de anticuerpos anti-HLA frente a la terapia alogénica; El número de pacientes encontrado no es suficiente para una completa evaluación, pero la terapia combinada con anti-TNF e inmunosupresores ha resultado coherente con la menor tasa de producción de anticuerpos anti-HLA en este estudio.

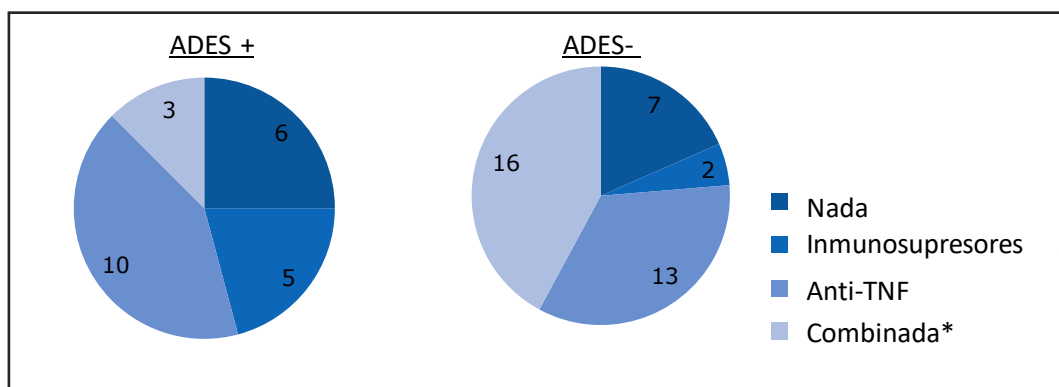


Figura R15: Distribución del total de pacientes ASC para las variables terapia concomitante y producción o no de anticuerpos tras la administración de ASC (ADES+ ó ADES-, respectivamente). Análisis de contingencia χ^2 con 3 grados de libertad: χ^2 :7,89; p-valor: 0,048.

* Terapia combinada con inmunosupresores más anti-TNF.

4.5.3.- Perfil inmunológico

A lo largo de los últimos años, se han estudiado las diferentes poblaciones inmunes y moléculas solubles circulantes en sangre periférica para conocer si una distribución dada se relacionaba con un mayor o menor grado de rechazo en el campo del trasplante renal. Tradicionalmente un perfil más inflamatorio se ha relacionado con episodios de rechazo en el que el balance de las citocinas IFN γ , IL2, IL10 y TGF β juegan un papel fundamental (Nickel, 2004; Brunet,2012). Además publicaciones más recientes reportan como un mayor número de células B y en concreto de células B transicionales (CD20+, CD24++, CD38++) se relacionan con la tolerancia del injerto (Newell, 2010; Chesneau, 2013) en detrimento de células B en su últimas etapas de diferenciación (plasmablastos; CD27++, CD38++).

4.5.3.1.-Perfil inmune al inicio de la terapia:

Desde el departamento de I+D de Tigenix se propusieron evaluar si las poblaciones del sistema inmune así como las citocinas correspondientes de cada paciente al inicio de la terapia tenían relación con la respuesta encontrada al evaluar la eficacia clínica. El objetivo que aquí nos ocupó, a pesar de no conocerse episodios de rechazo con el uso de ASC en humanos, fue la relación de las diferentes poblaciones de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y citocinas encontradas, con la producción de anticuerpos anti-HLA. Los resultados no arrojaron ninguna conclusión evidente para determinar qué perfil inmunológico a visita 0 iba a ser más susceptible de generar anticuerpos anti-HLA, ni en cuanto a poblaciones linfocitarias (linfocitos T y subtipos, linfocitos B y subtipos, linfocitos NK) (Tabla R7) ni en el perfil de citocinas pro/anti-inflamatorias a nivel intracelular o secretadas. Tan sólo el valor de monocitos totales y en concreto de las subpoblaciones de monocitos pro-I y pro-II (figura R16), aparecieron aumentadas con respecto al grupo no productor de anticuerpos y arrojaron diferencias

significativas, pero sólo al comparar sus medias en valores absolutos, en porcentaje, a pesar de existir una tendencia, la significación no resultó positiva para diferenciar a ambos grupos.

POBLACION INMUNE	Pacientes		p-valor (α :0.05)
	ADES + (%)	ADES - (%)	
T CD3+	75.5 \pm 1.8	76.6 \pm 1.9	0.703
●TCD4+	64.4 \pm 2.5	67.7 \pm 2.5	0.382
○T CD4+CM	25 \pm 2.6	22.1 \pm 2.1	0.399
○T CD4+ Naïve	25.7 \pm 3.7	23.4 \pm 2.6	0.596
○T CD4+ EM	36.3 \pm 3.4	37.4 \pm 2.7	0.816
○T CD4+ TEMRA	12.9 \pm 2.4	17.1 \pm 2.2	0.223
●T CD8+	35.6 \pm 2.5	32.3 \pm 2.5	0.382
○T CD8+CM	11.6 \pm 2.2	16.6 \pm 2.3	0.152
○T CD8+ Naïve	35.7 \pm 3.6	29.4 \pm 2.7	0.158
○T CD8+ EM	26.4 \pm 2.6	30.3 \pm 2.8	0.344
○T CD8+ TEMRA	26.2 \pm 3.2	23.6 \pm 2.5	0.528
T reg	2.8 \pm 0.4	2.1 \pm 0.2	0.135
NK	6.5 \pm 0.9	6.2 \pm 1.1	0.845
●B Naïve	68.2 \pm 3.1	61.9 \pm 3.8	0.231
●B unswitched	10.4 \pm 1.2	10.5 \pm 1.2	0.925
●B memory	21.4 \pm 2.1	27.6 \pm 2.9	0.125
●B transitional	10.5 \pm 1.7	9.9 \pm 1.7	0.826
●Plasmablastos	3.6 \pm 0.8	3.4 \pm 0.5	0.859
Monocitos	38.5 \pm 4.1	38.9 \pm 3.3	0.928
●Mo. Clasicos	52.4 \pm 6.3	61.6 \pm 4.2	0.211
●Mo. Pro I	25.5 \pm 4	20.3 \pm 2.4	0.233
●Mo. Pro II	22 \pm 2.9	18 \pm 2.7	0.339

Tabla R7: valores medios en porcentaje de las diferentes poblaciones y subpoblaciones mononucleares de sangre periférica en los pacientes ASC productores (ADES+) o no (ADES-) de anticuerpos anti-HLA previos a la administración alogénica. Se añade la significación obtenida al comparar ambos grupos por el test estadístico t-Student. *E: effector, CM: central memory, TEMRA: Effector memory RA.*

De entre todos los parámetros estudiados al inicio del ensayo, aquellos individuos que tuvieron en valores absolutos un mayor número de monocitos totales y en concreto del tipo pro-I y pro-II (CD14^hCD16+, CD14^lCD16+, respectivamente) y recibieron una administración local de ASC alogénicas, presentaron una mayor predisposición a generar anticuerpos anti-HLA con respecto al resto de pacientes de forma significativa (ANOVA de doble vía con prueba de Kruskal Wallis).

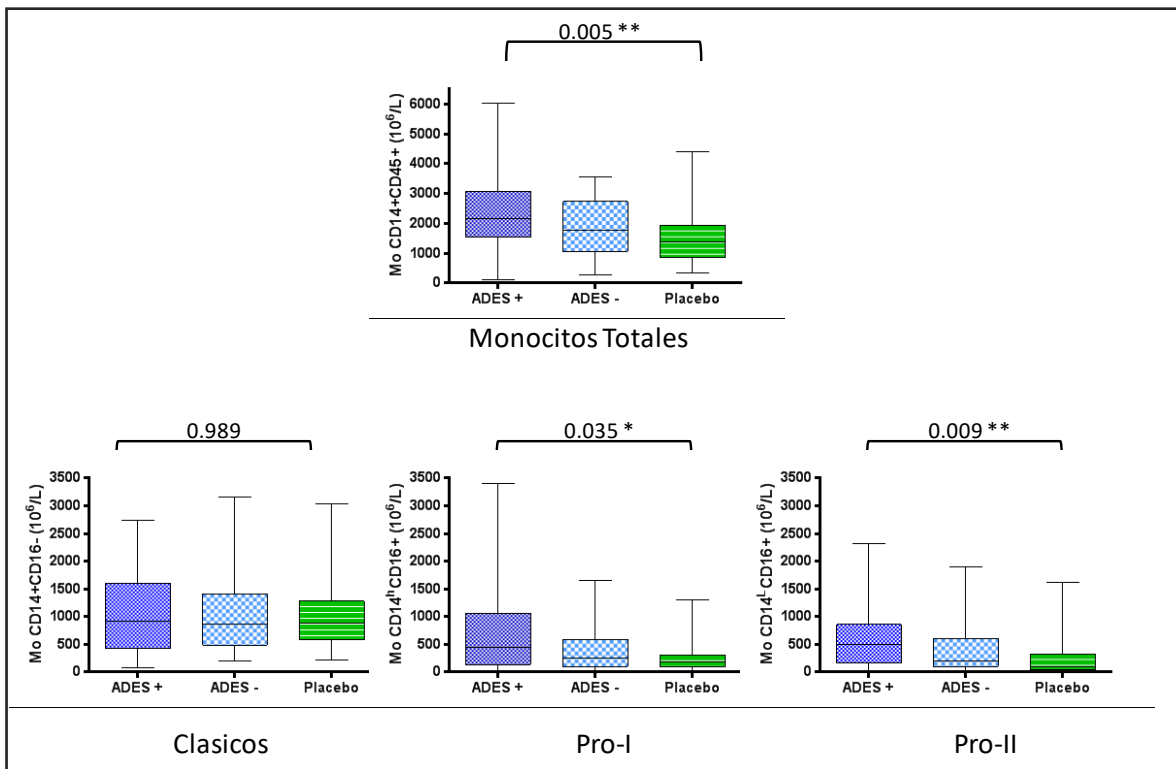


Figura R15: Valores de monocitos y sus subpoblaciones (clásicos, Pro-I y Pro-II) en valores absolutos para cada grupo de pacientes (productores o no de anticuerpos anti-HLA, ADES+ y ADES- respectivamente y pacientes placebo) a visita 0. Se representa la significación obtenida al aplicar el test estadístico Kruskal-Wallis.

Los pacientes ADES+, es decir, aquellos que generaron anticuerpos anti-HLA, presentaban una media de monocitos Pro-I y Pro-II en torno a $500 \times 10^6/L$, valor significativamente superior al encontrado en el grupo ADES- y placebo. Es un resultado que requiere validación en cohortes múltiples y más amplias. Sin embargo, es un importante primer paso en el entendimiento de la producción de anticuerpos anti-HLA en la terapia con ASC.

4.5.3.2.- Cambios tras el tratamiento asociados con la generación de anticuerpos:

No se encontraron diferencias significativas al comparar la oscilación en los porcentajes encontrados para los PBMC entre la visita 0 y la visita 2 en el grupo que producía anticuerpos anti-ASC (Tabla R8). Una vez más, pero sin resultar significativo, los monocitos fueron señalados, al presentar la mayor variación, esta vez con un aumento de los monocitos clásicos con respecto al inicio de la terapia acompañado de una reducción en el porcentaje de monocitos Pro-II (nivel de significación de 0.06) variación no observada en el grupo no productor de anticuerpos anti-HLA(Figura R16).

POBLACION INMUNE	Muestra		p-valor ($\alpha:0.05$)
	V0(%)	V2(%)	
T CD3+	75,5 \pm 1.8	78.5 \pm 2.0	0.24
●TCD4+	64.4 \pm 2.5	67.3 \pm 2.3	0.42
○T CD4+CM	25 \pm 2.6	21.6 \pm 2.8	0.18
○T CD4+ Naïve	25.7 \pm 3.7	27.2 \pm 3.9	0.66
○T CD4+ E	36.3 \pm 3.4	36.4 \pm 3.6	0.91
○T CD4+ TEMRA	12.9 \pm 2.4	14.8 \pm 2.6	0.34
●T CD8+	35.6 \pm 2.5	32.7 \pm 2.3	0.42
○T CD8+CM	11.6 \pm 2.2	10.4 \pm 2.0	0.55
○T CD8+ Naïve	35.7 \pm 3.6	34.4 \pm 4.2	0.93
○T CD8+ E	26.4 \pm 2.6	29.6 \pm 3.4	0.54
○T CD8+ TEMRA	26.2 \pm 3.2	25.7 \pm 2.8	0.79
T reg	2.8 \pm 0.4	2.9 \pm 0.5	0.60
NK	6.5 \pm 0.9	5.5 \pm 1.8	0.22
●B Naïve	68.2 \pm 3.1	66.9 \pm 3.0	0.71
●B unswitched	10.4 \pm 1.2	11.2 \pm 1.5	0.50
●B memory	21.4 \pm 2.1	21.9 \pm 2.1	0.94
●B transitional	10.5 \pm 1.7	10.6 \pm 1.2	0.88
●Plasmablastos	3.6 \pm 0.8	3.4 \pm 0.6	0.72
Monocitos	38.5 \pm 4.1	37.8 \pm 4.6	0.62
●Mo. Clasicos	52.4 \pm 6.3	61.8 \pm 6.7	0.06
●Mo. Pro I	25.5 \pm 4	21.6 \pm 4.2	0.20
●Mo. Pro II	22 \pm 2.9	16.6 \pm 3.1	0.06

TablaR8: Porcentajes medios de las diferentes poblaciones y subpoblaciones mononucleares de sangre periférica en los pacientes ASC a V0 y V2. Se añade la significación obtenida al comparar ambos grupos por el test estadístico t-Student. E: *effector*, CM: *central memory*, TEMRA: *Effector memory RA*.

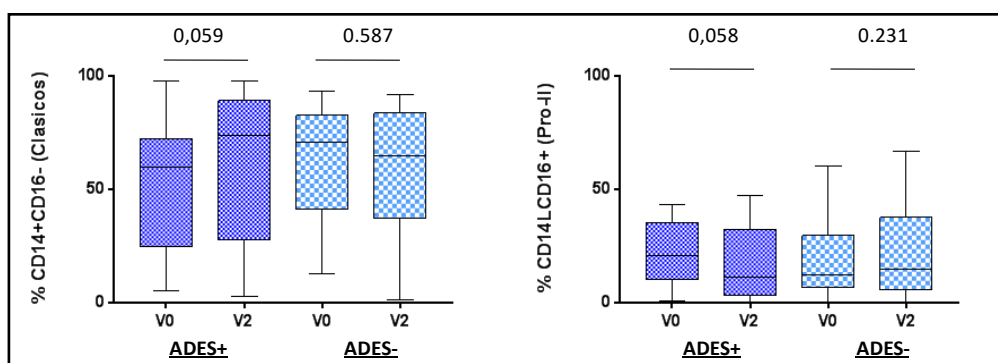


Figura R16: Comparación de la variación en los porcentajes de las poblaciones monocitarias CD14+CD16- (clásicos) y CD14lowCD16+(pro-II) entre la visita 0 y la visita 2 en los pacientes que generaron anticuerpos anti-ASC (ADES+) con respecto a los no productores (ADES-). Porcentajes normalizados con respecto al total de monocitos (CD14+CD45+).

Dados estos resultados, no pudimos establecer una relación entre la producción de anticuerpos anti-HLA y la variación de las poblaciones de PBMC en estos pacientes. Por tanto, podríamos deducir que en este ensayo clínico han resultado variables independientes.

Sin embargo, el perfil de citoquinas encontradas al inicio y a los 3 meses post-administración había variado de forma significativa en los siguientes supuestos:

- **Citocinas intracelulares:** Se midió por citometría de flujo la expresión de citocinas intracelulares IFN γ , TNF α , IL10 e IL17 en los linfocitos T en condiciones basales o al activarlos con PMA e ionomicina (figura R17). La expresión intracelular de IFN γ en linfocitos T en estado basal se vio reducida solo en el grupo de pacientes ADES+ de forma muy significativa (p: 0.023), variación que no se repitió al activar *in vitro* las células con PMA e ionomicina. El TNF α igualmente presentaba una disminución en estado basal en estos pacientes (p: 0.003), aunque en el grupo no productor de anticuerpos también se vio reducido de forma significativa (p: 0.039). En cuanto al nivel de expresión de IL10 en linfocitos T, al ser activados, también se redujo de forma significativa en los pacientes productores de anticuerpos (p: 0.040), a diferencia de los otros dos grupos

En el caso de la IL17, no se detectaron cambios relevantes.

Es decir, en los pacientes que generaban ADES, a pesar de no encontrar un cambio en las poblaciones T periféricas, su expresión basal de IFN γ al igual que la capacidad total de producir IL10 había sido reducida tras la administración de alo-ASC y posterior generación de anticuerpos anti-HLA. En los pacientes ADES- también se veía un descenso en los valores medios de ambas citocinas, circunstancia que no se correspondía con los resultados en el brazo de pacientes placebo.

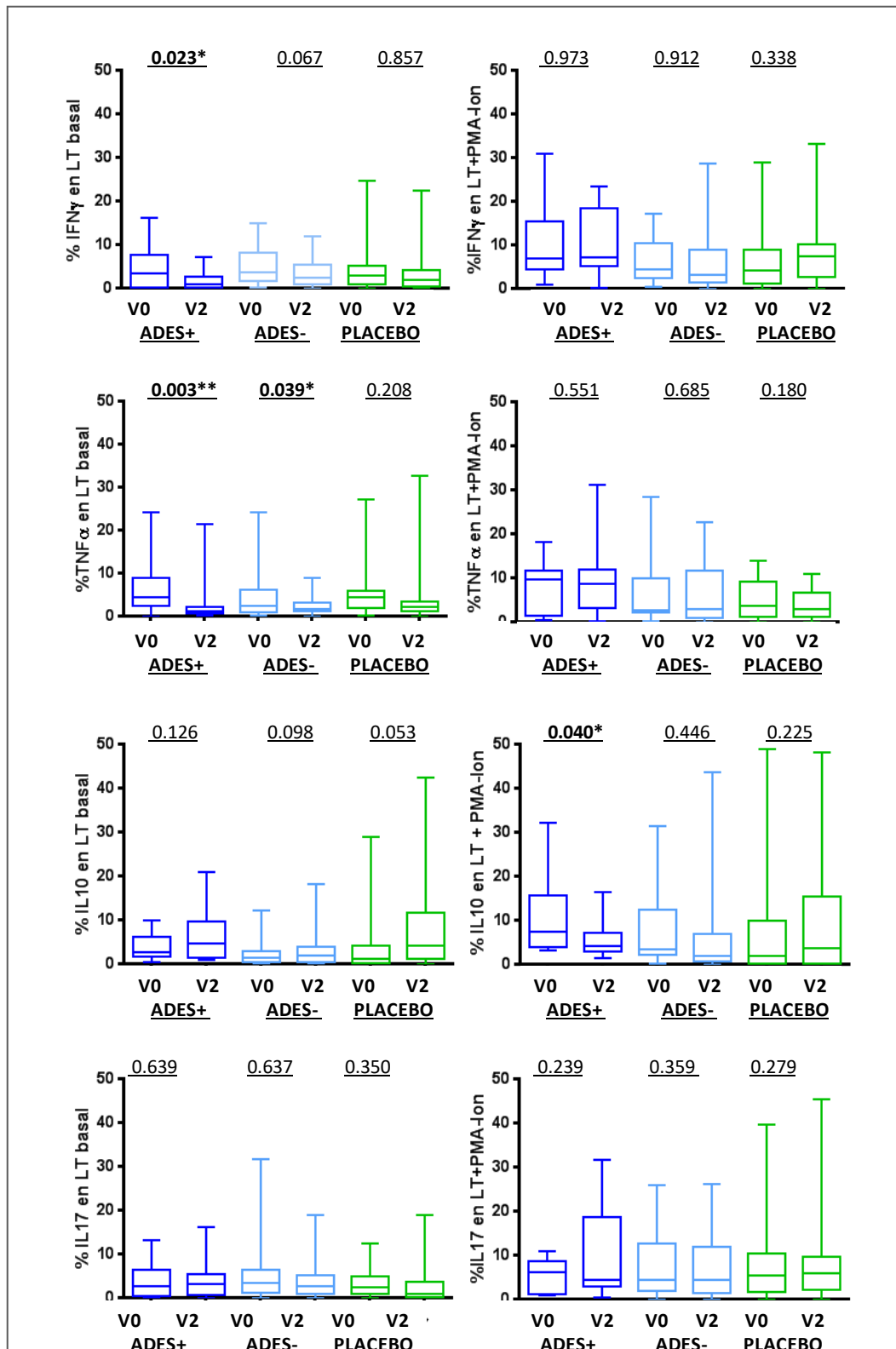


Figura R17: cambios significativos en la expresión de citocinas intracelulares IFN γ , TNF α , IL10 e IL17 de los linfocitos T en estado basal y activados con PMA e ionomicina respectivamente, de los pacientes productores de anticuerpos con respecto a los pacientes que no producen anticuerpos y los pacientes que recibieron placebo, entre el inicio de la terapia y los 3 primeros meses post administración (V0 y V2).

- Citocinas secretadas al medio de cultivo con PBMC: En los pacientes que generaron anticuerpos anti-HLA tras la administración de ASC, la secreción al medio de cultivo de IL1 beta y la IL17a, citocinas pro inflamatorias, se redujo entre las visitas 0 y 2 cuando las PBMC de estos pacientes se cultivaron junto a PMA e ionomicina (figura R18), condición indispensable para conseguir el máximo potencial secretor en cada caso. No se corroboraron estos resultados para el resto de citocinas estudiadas (IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN γ , TNF α y TGF β) (datos no mostrados)

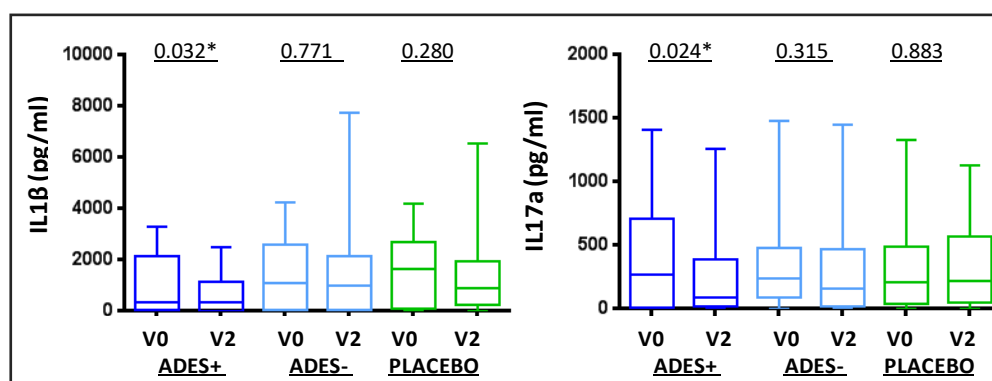


Figura R18: cambios en la secreción de citocinas al medio de cultivo en picogramos por mililitro (pg/ml) al incubar PBMC en presencia de PMA+ionomicina de cada grupo de pacientes entre el inicio de la terapia y los 3 meses post administración.

4.6.-IMPACTO DE LA PRESENCIA Y GENERACIÓN DE ADES SOBRE LA EFICACIA CLÍNICA

Numerosos ensayos clínicos publicados (Clinical Trial.gov) avalan la eficacia de las ASC alogénicas en terapias inmunomoduladoras. De hecho, Cx601 en fase I/IIa mostró eficacia a las 24 semanas de seguimiento en el 56% de los pacientes con fístulas tratados con 20millones de ASC (datos que duplican el porcentaje de mejora con inhibidores del TNF). La eficacia fue medida como el cierre completo y re-epitelización de la zona afectada en ausencia de drenaje (de la Portilla,F., 2013). Sin embargo, aunque pudieron generarse anticuerpos anti-HLA en algunos de los pacientes, en aquella ocasión, no se realizaron en profundidad estudios que permitieran discriminar una posible correlación entre la generación de anticuerpos anti-HLA y la eficacia conseguida tras la administración del producto alogénico.

4.6.1.- Efecto de los anticuerpos anti-HLA

En el ensayo en fase III, los pacientes que recibieron Cx601 mostraron una probabilidad un 44% mayor de remisión combinada en comparación con el grupo control (placebo). En los análisis de seguimiento a las 52 semanas post-tratamiento se confirmó el perfil continuado de eficacia y seguridad del producto. Los resultados positivos en la semana 24 del ensayo fase III ADMIRE-CD se publicaron en The Lancet en julio de 2016 (Panés J, 2016). Sobre esos resultados ha podido compararse la evolución de los pacientes que presentaban anticuerpos anti-HLA con respecto a los individuos no sensibilizados, ni

previamente ni tras la terapia, al igual que se evaluó con respecto a la evolución de los individuos tratados con placebo de la cohorte en estudio (123 pacientes). Tal y como se describe en las condiciones del ensayo clínico en fase III, los pacientes fueron evaluados clínicamente a las 6,12,18,24 y 52 semanas, comprobando la eficacia del tratamiento, en base al cierre completo de las fístulas por ausencia de drenaje. Estos datos se analizaron en base a la presencia y producción de anticuerpos anti-HLA tanto al inicio como a los 3 y 12 meses post-administración. La distribución de pacientes según cada caso, se resume en las siguientes tablas:

Remisión clínica de la enfermedad de Crohn con fístulas perianales en la semana 12
Pacientes eASC

Visita 0 Presensibilizados	Visita 2 ADES+	Visita 6 ADES+	Número de pacientes	Remisión clínica a semana 12 Número de pacientes		
				Si	No	No evaluados
Si	Si	Si	4	1	3	0
Si	Si	No	1	0	1	0
Si	Si	No evaluado	1	1	0	0
Si	No	No	4	4	0	0
Si	No	No evaluado	0	0	0	0
No	Si	Si	9	6	3	0
No	Si	No	6	4	2	0
No	Si	No evaluado	2	0	2	0
No	No	No	34	23	11	0
No	No	No evaluado	2	1	0	1

Remisión clínica de la enfermedad de Crohn con fístulas perianales en la semana 24
Pacientes eASC

Visita 0 Presensibilizados	Visita 2 ADES+	Visita 6 ADES+	Número de pacientes	Remisión clínica a semana 24 Número de pacientes		
				Si	No	No evaluados
Si	Si	Si	4	1	3	0
Si	Si	No	1	0	0	1
Si	Si	No evaluado	1	0	0	1
Si	No	No	4	2	2	0
Si	No	No evaluado	0	0	0	0
No	Si	Si	9	6	3	0
No	Si	No	6	5	1	0
No	Si	No evaluado	2	1	0	1
No	No	No	34	21	13	0
No	No	No evaluado	2	1	0	1

Remisión clínica de la enfermedad de Crohn con fístulas perianales en la semana 52
Pacientes eASC

Visita 0 Presensibilizados	Visita 2 ADES+	Visita 6 ADES+	Número de pacientes	Remisión clínica a semana 52 Número de pacientes		
				Si	No	No evaluados
Si	Si	Si	4	1	1	2
Si	Si	No	1	0	0	1
Si	Si	No evaluado	1	0	0	1
Si	No	No	4	1	1	2
Si	No	No evaluado	0	0	0	0
No	Si	Si	9	5	1	3
No	Si	No	6	3	2	1
No	Si	No evaluado	2	0	0	2
No	No	No	34	17	5	12
No	No	No evaluado	2	0	0	2

Tabla R9: Listado resumen de la evolución y número de individuos en estudio según la sensibilización anti-HLA que presentaran a V0, V2 y V6 y el resultado de remisión clínica a las semanas 12, 24 y 52.

Para simplificar los datos y realizar un análisis estadístico sobre qué tipo de paciente ha respondido mejor a la terapia, dividimos al total de la cohorte en 4 grupos: placebo, pacientes ASC con anticuerpos anti-HLA (presensibilizados a V0 y sensibilizados con las ASC a V2, independientemente de su resultado a V6) y pacientes ASC sin anticuerpos anti-HLA. Observando en cada punto de seguimiento el porcentaje de individuos que conseguían una remisión en cada grupo (Figura R19) con respecto al total de evaluados.

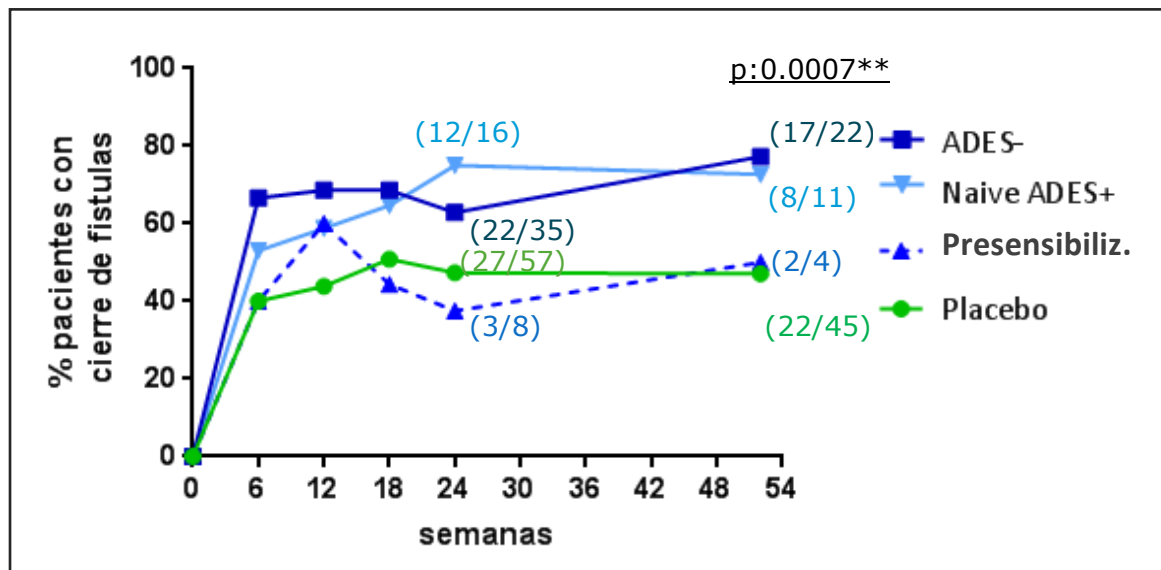


Figura R19: Evolución de los pacientes del ensayo clínico que recibieron placebo o ASC, este último dividido según presentaran a V0 ó generaran anticuerpos anti-HLA a V2 (Presensibiliz./ naive ADES+) y aquellos que no presentaran anticuerpos anti-HLA (ADÉS-). Se indica la fracción de pacientes con respuesta clínica favorable respecto al total de evaluados a semana 24 y 52. P-valor significativa por el test estadístico ANOVA de doble vía.

Los datos obtenidos indican diferencias claras entre los 4 grupos, consiguiéndose un porcentaje de cierre de fístulas en el 77,3% de los pacientes ASC no sensibilizados, evaluados al año de seguimiento, con respecto al 50% y 47,1% del grupo de presensibilizados y placebo respectivamente. Este porcentaje no fue estable a lo largo de la evaluación y en todos los grupos el número de pacientes evaluados de forma clínica a las 52 semanas fue inferior al del inicio, pero lo que sí ha podido constatarse, es cómo los pacientes ASC *naïve* que generaban anticuerpos anti-HLA, fueron capaces de cerrar fístulas en un porcentaje mayor al del grupo placebo y similar a aquellos pacientes ASC que no generaban anticuerpos, consiguiendo un 72,7% de cierre al año de seguimiento. Al aplicar el análisis estadístico ANOVA de doble vía se consigue una significación con un p-valor de 0,007. Esto nos indica que la generación de anticuerpos anti-HLA *de novo* posterior a la administración alogénica no se relaciona con una peor respuesta al

tratamiento, pudiendo evolucionar de forma favorable con la misma probabilidad que aquellos pacientes igualmente tratados pero sin generación de una respuesta humoral.

Los resultados indicaron en cambio, que la presencia de anticuerpos anti-HLA al inicio de la terapia puede incidir negativamente en la eficacia de la terapia con ASC alogénicas a largo plazo (al menos, de los 10 individuos presensibilizados, el número de pacientes con cierre de fístulas descendió a partir de la semana 12). No obstante, la evaluación clínica pudo constatar en 8 pacientes a semana 24 y tan sólo 4 a semana 52, por tanto, estos resultados no pueden extrapolarse para concluir de forma clara que los pacientes presensibilizados en la administración de ASC alogénicas en la enfermedad de Crohn fistulizante presenten un pronóstico negativo. Se hace necesario confirmar estos resultados con un mayor número de presensibilizados al inicio y aclarar la evolución real de estos pacientes y el valor pronóstico de presentar anticuerpos anti-HLA de forma previa.

4.6.2.-Efecto de los anticuerpos anti-MICA

Estudios previos indican que los anticuerpos anti-HLA y anti-MICA están involucrados en la patogénesis del rechazo humoral renal y su presencia puede ser detectada en la etapa pre y post trasplante (Panigrahi A, 2007. Álvarez-Márquez, 2009. Cox, 2011). La presensibilización de receptores de trasplante renal contra antígenos MICA se asocia con mayor frecuencia de pérdida del injerto además, podría contribuir a la pérdida del mismo en pacientes con buena compatibilidad HLA (Zou Y, 2007). Sin embargo, está descrito que las ASCs no presentan antígenos MIC ni en condiciones basales ni tras estimulación con factores inflamatorios como el IFN γ (de la Rosa y col., 2012). Además, hay que tener en cuenta que los anticuerpos anti-MICA, están englobados dentro del grupo de anticuerpos no-HLA y pueden ir dirigidos frente a aloantígenos, pero también frente a autoantígenos. Este último caso, se da en condiciones pro inflamatorias, en donde de forma escalonada se va perdiendo la tolerancia, debido a la destrucción de epitelios, que deja al descubierto antígenos no presentados en la selección tímica, el estrés celular se acompaña de apoptosis con aparición de epítomos crípticos y de modificaciones post-traduccionales que dan lugar a neoepítomos (López-Vázquez, 2014). Por último, se ha descrito una estrecha relación de agentes infecciosos y auto-péptidos que podría conducir a la activación cruzada de autoreactividad T y B.(Zhang y col., 2010).

Gracias a la plataforma Luminex combinado con el ensayo de LSM, hemos podido detectar anticuerpos dirigidos contra estos antígenos MIC, que por técnicas clásicas de serología no sería posible. En este ensayo, existen dos microesferas que contienen varios antígenos correspondientes a alelos del gen MICA. Por tanto, para todos los pacientes de nuestro ensayo, se testaron las muestras al inicio de la terapia, a las 12

semanas y al año post-administración, tanto del grupo placebo como del grupo que recibió ASC.

En el total de los 123 pacientes estudiados, se detectaron 6 pacientes (figura R20) del grupo ASC (9,3%) con anticuerpos anti-MICA y 5 pacientes en el grupo placebo (8,3%) al inicio del tratamiento (pre: 1). Además 3 pacientes del grupo ASC y 4 del grupo placebo, generaron anticuerpos anti-MICA a los 3 meses post-administración (pre: 0, post 1). A su vez, 1 paciente dentro de cada grupo tornó a negativo a los 3 meses (pre: 1, post: 0).

ASC N=63		placebo N=60	
	POST		POST
PRE	0	1	1
0	54	3	4
1	1	5	4

Figura R20: Resultados de la determinación de anticuerpos anti-MICA al inicio (pre) y a los 3 meses post-administración. 0:negativo, 1: positivo.

La paridad de los resultados con cambios similares tanto en el grupo ASC como en el placebo, nos indicó que la sensibilización anti-MICA es independiente a la administración de las ASC. Sin otros estudios que avalen estos resultados, no podemos concluir que la valoración de la compatibilidad y anticuerpos en las moléculas MICA no sea necesaria en las terapias con células mesenquimales alogénicas. No obstante, dado que se han descrito tradicionalmente como moléculas de respuesta a estrés celular, quisimos valorar su relación con el grado de severidad de la enfermedad de Crohn fistulizante antes y después del tratamiento.

Los resultados indicaron que ningún individuo del grupo placebo con anticuerpos anti-MICA cerró sus fístulas en ninguna de las visitas de evaluación (figura R21). Del grupo ASC, 3 de los 6 pacientes positivos de forma previa, presentaron una respuesta clínica favorable a las 12 semanas de evaluación, pero finalmente 4 de 5 (1 no continuó en el estudio), es decir, el 80% de los pacientes evaluados con anticuerpos anti-MICA al inicio del ensayo, no consiguieron una eficacia con la terapia ASC al año del tratamiento.

Dados los resultados, se determinó el valor pronóstico de los anticuerpos anti-MICA por análisis de contingencia, y comprobación por Test de Fisher pero no revelaron diferencias significativas como para definir a los anticuerpos anti-MICA como un factor negativo en la evolución de los pacientes con enfermedad de Crohn refractaria, además, el hecho de generarlos tampoco se asociaba a una peor respuesta (datos no mostrados). Aunque, podría significar que los pacientes positivos para los anticuerpos anti-MICA tenían una patología más severa o desarrollada.

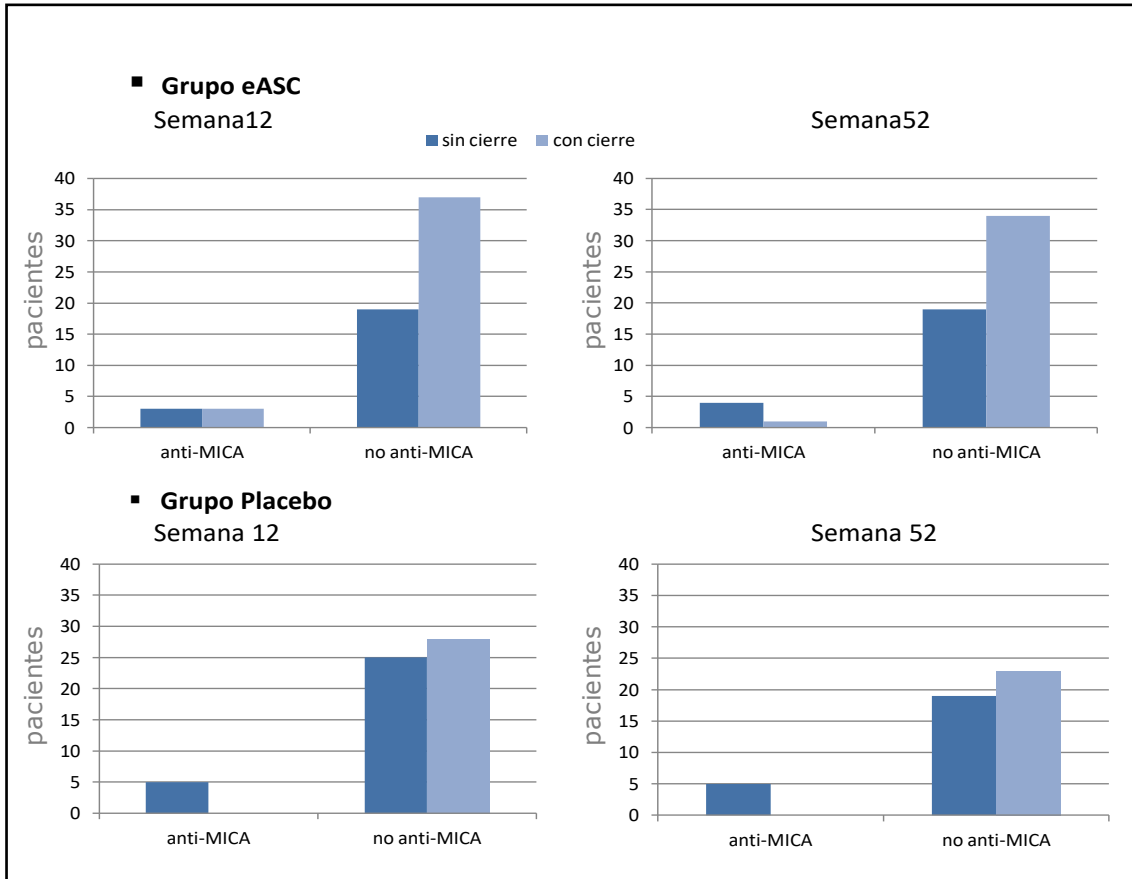


Figura R21: Distribución de pacientes según el grupo de administración, presencia de anticuerpos anti-MICA al inicio del ensayo y el grado de respuesta clínica conseguida a la semana 12 y 52.

Existen numerosas formas de determinar el grado de afección de la enfermedad en base a índices de actividad, uno de los más utilizados es el índice basado en varias manifestaciones clínicas PDAI (*Perianal disease activity index*, en sus siglas en inglés), descrito por Irvine EJ, en 1995. Este índice consta de 5 variables, cada una de las cuales son graduadas hasta 5 puntos, en función de si no presenta síntomas o los presenta de forma severa, de tal forma que un score alto implica una afectación muy grave de enfermedad perianal. Entre los datos recogidos, el PDAI, fue uno de los principales factores para definir la severidad de los pacientes en el ensayo, por ello, decidimos comprobar nuestra hipótesis al comparar el valor de este índice con la presencia de anticuerpos anti-MICA en la totalidad de los 123 pacientes evaluados (figura R22).

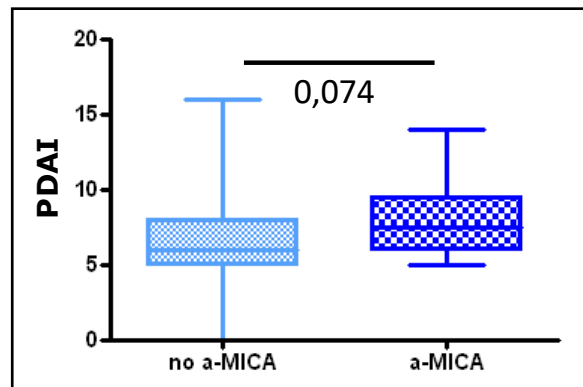


Figura R22: Análisis comparativo del PDAI al inicio del ensayo en el total de pacientes presensibilizados o no con anticuerpos anti-MICA (a-MICA) y comprobación por test t-Student ($p:0,074$).

El valor medio del PDAI en los pacientes que presentaban anticuerpos anti-MICA era de $8,1 \pm 0,84$, mientras que para los pacientes sin anticuerpos anti-MICA, se situaba en $6,5 \pm 0,26$. A pesar de que la diferencia no es significativa al aplicar el test estadístico t-Student, los individuos con sensibilización anti-MICA presentan un índice mayor. En cualquier caso, nuestra representación de individuos positivos, es muy limitada, así que podría ser un parámetro para valorar en futuras administraciones con un mayor número de pacientes y así comprobar, si en aquellos pacientes con mayor afectación de fístulas en la enfermedad de Crohn y por tanto, con un PDAI más alto también se relaciona con una mayor probabilidad de presentar anticuerpos anti-MICA.

DISCUSIÓN

5.-DISCUSIÓN

Las células madre mesenquimales (MSC) han demostrado eficacia en el tratamiento de trastornos inflamatorios, isquémicos e inmunológicos en modelos animales experimentales (Phinney, 2007. Christopeit, 2008. Lee, 2009) y han arrojado resultados prometedores en ensayos clínicos en humanos (Le Blanc, 2004. Tolar 2010). Durante la última década, las MSC han surgido como potentes moduladoras de las células efectoras del sistema inmune, demostrado en ensayos *in vitro*. Por ejemplo, las MSC suprimen la proliferación de células T en respuesta a alo-antígenos (Maccario, 2005. Rem, 2008. Giuliano, 2011) e inducen la formación de células T con un fenotipo regulador (Selmani, 2008). También inhiben la diferenciación de células T CD4 naïve en células pro inflamatorias TH17 (Ghannam, 2010), bloquean la maduración y función de las células dendríticas (Chiesa, 2011) y suprimen la activación de células NK y citolisis (Spaggiari, 2008). Estos hallazgos han estimulado el uso de terapias basadas en MSC alogénicas en humanos, a pesar del importante papel que juegan los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad en el rechazo de injertos.

En concreto, las células mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASC), a pesar de estar definidas en menor grado que las MSC derivadas de médula ósea, comparten con estas últimas muchas de sus propiedades esenciales (Puissant, 2005) , misma potencialidad y misma capacidad replicativa, con una serie de ventajas añadidas como son la fácil accesibilidad y disponibilidad, el rendimiento superior (hasta 100 veces más de MSC extraídas/gramo de tejido) y que no se requiere movilización previa con factores externos. Es por ello, que se han conseguido igualmente resultados prometedores en modelos animales y estudios preclínicos en humanos que confirman la eficacia y el papel inmunomodulador de las ASC en el control de la activación del sistema inmune (Schälffler, 2007. DelaRosa 2009). Las características inmunomoduladoras de las ASC han sido corroboradas mediante análisis inmunológicos monitorizados durante los estudios *in vivo* (Álvaro-Gracia, 2017). Sin embargo, en estos desarrollos clínicos en humanos, principalmente enfocados al estudio de la seguridad y eficacia terapéutica del tratamiento, pocas veces se incluye un estudio exhaustivo que permita conocer el impacto inmunológico de este tipo de terapia alogénica, dejando de lado un aspecto de especial relevancia a la hora de determinar la respuesta del paciente al tratamiento celular aplicado.

Los estudios realizados igualmente en modelos experimentales indican que las MSC alogénicas (alo-MSC) desencadenan respuestas inmunes de tipo celular y humoral específicas frente al donante *in vivo*. Por ejemplo, los estudios preclínicos realizados en roedores (Eliopoulos, 2005. Sudres, 2006, Camp, 2009), porcinos (Poncelet, 2007) y primates no humanos (Beggs, 2006, Isakova, 2010) demuestran que las MSCs alogénicas inducen respuestas mediadas por células T y B. De hecho, la detección de anticuerpos específicos anti-donante en el suero de los receptores proporciona una clara evidencia

del reconocimiento alogénico por las células B y células T (en las respuestas T-dependientes). No obstante, existen diferencias entre especies en la aloreactividad de MSC y la relación con su beneficio terapéutico, que pueden deberse al hecho de que las respuestas al aloinjerto se evalúan de forma heterogénea entre los distintos ensayos clínicos en desarrollo. Por lo tanto, el estado de privilegio inmune de las alo-ASC sigue siendo ambiguo y cuestiona su utilidad para tratar enfermedades inflamatorias en humanos.

Previo al presente trabajo se llevó a cabo un estudio inmunológico piloto a partir de muestras de sangre obtenidas de 23 pacientes pertenecientes al ensayo clínico en fase II donde se administraron igualmente ASC alogénicas (alo-ASC) de forma local para el tratamiento de las fístulas perianales complejas (de la Portilla, 2013), ese ensayo, permitió analizar de una forma austera la presencia de anticuerpos anti-HLA preformados y generados después del tratamiento (hasta 12 pacientes presentaron un resultado positivo en las muestras post-administración analizadas por tecnología Luminex). Estos resultados, aunque muy preliminares, justifican la exploración en profundidad de los signos de actividad biológica de las ASC que puedan ser detectados a nivel sistémico. En el presente trabajo, se ha estudiado un subgrupo de 123 pacientes, pertenecientes al ensayo clínico en fase III del producto Cx601 (*Clinical trial.gov*: NCT01541579). En todos ellos, se midió la presencia de anticuerpos anti-HLA antes y después del tratamiento dentro del estudio a doble ciego. Todo ello, nos permitió de forma indirecta validar la tecnología de determinación de anticuerpos anti-HLA y nuestra metodología de análisis. Igualmente y de forma complementaria, se demostró la capacidad de reconocimiento *in vitro* de las ASC por parte de los anticuerpos anti-HLA definidos y la potencial capacidad lítica de los mismos. Además, los resultados se relacionaron con el tipaje HLA de cada paciente, tratamiento concomitante a la terapia celular y también con otros parámetros inmunes detectados a nivel sistémico. Como valor añadido al estudio de seguridad y eficacia, se ha determinado la progresión de cada paciente incluido en el ensayo en relación al mantenimiento de estos anticuerpos, definiendo un valor pronóstico que será de gran utilidad en el perfeccionamiento de futuros estudios.

5.1.-VALORACIÓN GLOBAL DE LA DETERMINACIÓN DE ANTICUEROS ANTI-HLA

La mayor aportación del presente trabajo es la ratificación de que tras una administración alogénica de ASC humanas (en una dosis de 120 millones de ASC en un volumen de 5 ml), por vía intralesional, se produce una respuesta humoral en un 36,2% de los pacientes, dirigida específicamente frente a las moléculas HLA de clase I del donante de ASC. No se detectó ningún tipo de respuesta de reconocimiento frente a las moléculas HLA de clase II, ni por Luminex (no se detectaron nuevos resultados positivos post-administración), ni reconocimiento *in vitro* a través de citometría de flujo convencional en aquellos pacientes que los presentaban de forma previa. Se ha descrito

ampliamente que las ASC, presentan moléculas HLA de clase I en bajo grado pero no presentan HLA de clase II en membrana en estado basal (de la Rosa, 2009. Ren, 2012. Barberini, 2014) y a pesar de que algunas citocinas pro inflamatorias como el IFN γ pueden inducir su expresión *in vitro*, entre nuestros resultados no hubo ningún tipo de cambio en los títulos para anticuerpos anti-HLA de clase II, teniendo en cuenta que las fístulas perianales son resultado de un microambiente altamente inflamado y de forma crónica. Estos resultados nos permiten intuir de forma indirecta que el estado inflamatorio en la zona de administración ó bien la densidad antigénica HLA de clase II expresada para ser detectada por el sistema inmune del receptor no son suficientes. Por otra parte también puede influir que la supervivencia de estas células sea más corta que el tiempo necesario para que puedan inducir la expresión de moléculas de HLA de clase II en membrana. Futuros ensayos para definir la relevancia real de antígenos HLA de clase II deberían diseñarse al menos en modelos animales, ya que no suelen tomarse biopsias seriadas de los pacientes tratados y no es posible éticamente utilizar ASC marcadas.

En el presente trabajo, se utilizaron muestras de plasma, debido a que el material de partida fueron muestras de sangre en tubos EDTA, al inicio, 3 meses y 12 meses de seguimiento. Todas ellas fueron analizadas a través de tecnología Luminex, inicialmente con el ensayo de cribaje para la detección de anticuerpos, LabScreen MIXED™ (LSM), estableciendo un *cut-off* de 800 unidades de intensidad media de fluorescencia (IMF), y posteriormente con el ensayo LSA, en donde se definió igualmente un corte, esta vez utilizando fluorescencia estandarizada, de 20000 SFI (correspondiente a aproximadamente a 800 unidades de IMF). De los 123 pacientes analizados se encontraron anticuerpos anti-HLA al inicio del ensayo tanto en el grupo de pacientes placebo como en el grupo con tratamiento ASC en un porcentaje similar (16,6% y 19% respectivamente, en su mayoría dirigidos frente a clase I). Dado que no hay datos de trasplantes, estas sensibilizaciones pueden ser debidas a transfusiones o embarazos previos, de hecho el 86,3% de los pacientes presensibilizados eran mujeres.

A la hora de confirmar una respuesta humoral a la terapia alogénica se tuvo en cuenta no sólo la positividad del ensayo LSM sino además, el cambio de perfil en los patrones de respuesta con el posterior análisis de las especificidades encontradas con el ensayo LSA. Es importante destacar la utilidad de realizar un análisis combinado de LSM, LSA, patrones de respuesta y análisis estructural, ya que en esta tesis se encontró un total de 4 muestras con falsos positivos con el ensayo LSM. La introducción del ensayo sobre fase sólida para la detección y caracterización de anticuerpos anti-HLA en el trasplante, a la vez que proporciona una mayor sensibilidad que la obtenida por los ensayos de CDC, ha dado como resultado un nuevo paradigma con respecto a la interpretación de los ADES. En particular, ha permitido la detección de anticuerpos no detectables por CDC, cuya significación clínica sigue sin ser demostrada. Según las recomendaciones de la Sociedad de Trasplante en la Conferencia de Consenso sobre Anticuerpos en Trasplante (Tait, 2013), la tecnología en fase sólida debe utilizarse para detectar anticuerpos contra los loci HLA, tales como C, DQA, DPA, Y DPB, que no se detectan

fácilmente por otros métodos. Pero su uso debe complementarse con ensayos que utilicen células para examinar las correlaciones entre los dos tipos de ensayos y establecer la probabilidad de un cruce positivo (XM+). Además, señalar y tener presente los factores técnicos que pueden influir en los resultados y su interpretación clínica cuando se utiliza la tecnología con HLA recombinantes. En estas 4 muestras, las principales especificidades encontradas, tenían fluorescencias bajas, cercanas al punto de corte, pertenecían en su mayoría al locus C, coincidiendo con especificidades frecuentes en la detección de lo que se conocen como anticuerpos naturales (Morales-Buenrostro, 2008) sin relación con los antígenos de las ASC donante, de hecho cuando fueron testadas por la prueba cruzada por citometría de flujo (FCXM) resultaron negativas.

La razón de la presencia de estos anticuerpos naturales, es decir, anticuerpos dirigidos y derivados de respuestas inmunes frente a antígenos presentes en microorganismos infecciosos, alérgenos o proteínas de la dieta, es que a través de mecanismos de mimetismo molecular son reconocidos y fijados por las microesferas del ensayo multiplex (El-Awar, 2009). En la bibliografía actual, aún no hay una conclusión clara acerca de su posible implicación en el rechazo, aunque la mayoría de los estudios publicados, abogan por caracterizarlos como especificidades irrelevantes, como demuestra el estudio realizado por Nikaein al comprobar la reactividad de antisueros de pacientes en lista de espera de trasplante cardiaco (Nikaein, 2012) testados por LSA con FCXM utilizando microesferas no tratadas o modificadas con tampones de elución para eliminar la cadena $\beta 2$ microglobulina y el antígeno presentado por la molécula HLA, demostrando que la mayoría de las FCXM negativas en pacientes positivos por LSA se debían a antisueros con especificidades dirigidas a antígenos ocultos. Es decir, la mayoría de las especificidades relacionadas con este fenómeno, se caracterizan por reconocer epítopos no expuestos en moléculas HLA unidas a antígeno, es decir, reconocen aminoácidos crípticos en la conformación natural de la proteína.

Además de la sensibilidad que la tecnología Luminex nos ofrece, ha podido comprobarse su reproducibilidad, permitiéndonos diseñar los patrones de respuesta. En esta tesis ha podido comprobarse como representan una novedosa aportación al laboratorio de histocompatibilidad. Su principal ventaja con respecto al ensayo LSA es su rapidez y coste mínimo para detectar una nueva sensibilización, evitándonos realizar el ensayo de especificidades en aquellos individuos que aún teniendo un LSM positivo en una visita posterior, no hubieran modificado su patrón. Con los resultados expuestos se demuestra cómo los patrones denominados 1→1 (perfiles semejantes), no arrojan nuevas especificidades con respecto al inicio de la terapia al analizar la muestra de los 3 y 12 meses con el ensayo LSA. Mientras que los patrones 1→2 (perfiles no superponibles), representaban a individuos presensibilizados que además generaban anticuerpos *de novo* tras la administración alogénica de ASC (figura R2 y R3). Estos resultados confirman los obtenidos previamente en el ensayo clínico en fase II en el tratamiento con alo-ASC en

artritis reumatoide refractaria, presentados de forma preliminar en el Congreso de la Sociedad Europea de Inmunología (ANEXO) donde la correspondencia entre patrones de respuesta LSM y LSA fue demostrada igualmente.

5.2.-RESPUESTA ANTI-HLA OBTENIDA CON RESPECTO A OTRAS TERAPIAS ALOGÉNICAS

Dados los resultados obtenidos, la infusión de alo-ASC se sitúa a nivel inmunológico más próximo al trasplante de órgano sólido que al trasplante de médula ósea. Como el primero, la respuesta alogénica es unidireccional, huésped (inmunocompetente) versus injerto (alo-ASC). Aunque hay que señalar las importantes diferencias que presentan las alo-ASC respecto al injerto de órgano sólido y que influirán en la respuesta alogénica del receptor.

Las alo-ASC se constituyen como un tipo celular homogéneo sin endotelios y más importante, sin capacidad presentadora de antígeno demostrada *in vivo*, es decir, sin capacidad de reconocimiento alogénico directo, en el que las APC del donante (en este caso las alo-ASC) interactúen de forma directa con los linfocitos T del receptor. Aunque esta vía se presenta poco probable, hay varios grupos que han considerado la posibilidad de que las propias MSC puedan comportarse como APC *in vitro* bajo condiciones inflamatorias (Chan 2006, Stagg 2006). El reconocimiento directo implicaría por tanto, un reconocimiento del alo-MHC sobre las ASC vivas, lo más probable, en ausencia de ligandos de coestimulación y por parte de células T de memoria.

Si las ASC no pueden comportarse como APC *in vivo*, implica que la presentación de los aloantígenos debe dirigirse a través de las propias células presentadoras del receptor, es decir, a través de un reconocimiento indirecto. Este tipo de vía es hasta la fecha de los más aceptados en el campo de la terapia celular, de tal forma que las proteínas derivadas de la lisis o apoptosis de las MSC serían captadas por CPA del receptor y presentadas en sus propias moléculas de MHC de clase I y II a los linfocitos T CD8+ y T CD4+, respectivamente. En cualquier caso los efectos inmunosupresores que las MSC hubieran ejercido sobre las células dendríticas también conducirían a un ambiente tolerogénico. Finalmente, se ha propuesto una tercera vía de reconocimiento alogénico denominada semi-directa por la cual células T aloreactivas del receptor pueden reconocer péptidos íntegros unidos a moléculas MHC del donante sobre una célula del receptor (Russo, 2000. Herrera, 2004). En el caso concreto de las MSC, es conocido que este tipo celular produce microvesículas extracelulares (exosomas) que pueden contener miRNA y proteínas específicas que podrían ser captadas por CPA cercanas (Biancone, 2012), es decir las CPA del paciente podrían captar microvesículas de las alo-ASC con moléculas HLA íntegras y presentarlas en su membrana para el posterior reconocimiento T.

Otra gran diferencia es la ausencia en los pacientes con enfermedad de Crohn del potente tratamiento inmunosupresor utilizado en el trasplante clínico (habitualmente triple terapia con Corticoides, inhibidores de Calcineurina y bloqueantes del ciclo celular, que condicionan un bloqueo de una respuesta T *de novo*) por lo tanto, esta falta de

inmunosupresión química facilitaría la respuesta adaptativa paciente *versus* alo-ASCs. Aunque, uno de los principales mecanismos inmunomoduladores de las ASC descritos es la inhibición de las respuestas adaptativas, bloqueando la maduración de las células dendríticas o aportando una imprimación de un perfil tolerogénico en ellas, además de la inhibición de la actividad y proliferación de células T y B (Maccario, 2005. Ren, 2008 Selmani, 2008. Chiesa, 2011). Una de las posibles deducciones en base a la anterior afirmación es que en aquellos pacientes que hayan generado anticuerpos, no se ha conseguido un bloqueo de la respuesta adaptativa (la presencia de anticuerpos anti-HLA necesita que previamente haya activación T por células dendríticas y cooperación células T-B activadas), y por tanto, podría suponer que tampoco se consiga una disminución de la inflamación en el área afectada. Sin embargo, hay que tener en cuenta, que la detección de anticuerpos anti-HLA de forma sistémica, es sólo el punto final de un proceso largo que implica a una gran variedad de mecanismos, condiciones y espacios anatómicos. Por lo tanto, el mecanismo de generación de anticuerpos anti-HLA en la infusión de alo-ASCs es el principal factor indicativo de que ha habido un reconocimiento e interacción entre el sistema inmune del receptor y las ASCs en la zona afectada, que ha sido transmitido a ganglios linfáticos para favorecer/modular la generación de anticuerpos anti-HLA. La definición de la relación entre esta generación de anticuerpos y la eficacia clínica es uno de los objetivos que se pretende conseguir con este trabajo.

Nuestro grupo no ha sido el único en publicar una tasa de generación de anticuerpos anti-HLA en terapia celular con células mesenquimales alogénicas y comparar su impacto con la eficacia en el tratamiento (Tabla D1). Sin embargo, aún en estos días hay gran controversia en decidir cuál de las dos estrategias, terapia autóloga o alogénica, es más segura y beneficiosa. Aunque las auto-MSC y alo-MSC se están utilizando en los ensayos clínicos, las comparaciones directas entre las dos fuentes de células son escasas. Un ejemplo es el estudio POSEIDON, donde se comparó la seguridad y la eficacia de las auto y alo-MSC en la regeneración de lesión cardíaca en pacientes con isquemia cardíaca crónica (Joshua 2012). Desafortunadamente, a los 30 días, la mejoría clínica fue limitada en ambos grupos. Las auto-MSC se asociaron con mejoras marginales en una prueba de 6 minutos a pie como se registró en el *Minnesota Living* junto a un cuestionario de insuficiencia cardíaca, mientras que las alo-MSCs se asociaron con menos arritmias, pero sin ser estadísticamente significativas. Sin un fuerte efecto positivo, un grupo de placebo ó el análisis de la persistencia de la célula donante, es difícil usar este ensayo para comparar eficazmente el efecto de cada MSC. No obstante, tanto el ensayo POSEIDON como un reciente ensayo de *Mesoblast* de fase II, informaron de la generación de anticuerpos anti-donante en el 13% de los pacientes tratados con alo-MSC (Wang, 2017). Otros estudios como el desarrollado en diabetes tipo 2 (Skyler, 2015) relevaron la eficacia en la disminución de Hemoglobina glicada en pacientes con una administración intravenosa de alo-MSC, con respecto al grupo placebo sin encontrar anticuerpos anti-HLA en la cohorte.

Autores	Indicación	Nº pacientes tratados	Fuente de MSC	Vía	Tasa de anti-HLA	Tecnología de análisis
Le Blanc y col. 2008	GvHD	55	BM-MSC (idénticas, haplo y alo-MSC)	Intravenosa (varias dosis)	No se reporta	No se reporta
Joshua y col. 2012	Isquemia crónica ventricular	31	BM-MSC (16 auto + 15 alo-MSC)	Inyección transendocardica (varias dosis)	2 de 15 (13%)	No se reporta
Skyler y col. 2015	DM tipo 2	15 + 16 (placebo)	Alo-BM-MSC	Intravenosa (dosis única)	0	Plataforma Luminex
Wang y col. 2017	Osteoartritis	11 + 6 placebo	Alo-BM-MSC	Intra-articular (dosis única)	5 de 6 (w4) 5 de 7 (w36)	Análisis PRA
Álvaro-Gracia y col. 2017	Artritis Reumatoide	46 + 7 placebo	Alo-ASC	Intravenosa (3 dosis)	17% a punto final.	Plataforma Luminex
García-Sancho y col. 2018	Osteoartritis Enfermedad de disco degenerativo	13	Alo-BM-MSC	Intra-articular/intra-discal (dosis única)	2 de 13 (15%)	Plataforma Luminex

Tabla D1: Ensayos clínicos registrados en los que se ha reportado un análisis de anticuerpos anti-HLA o compatibilidad HLA hasta la fecha. PRA: *Anticuerpos reactivos contra el panel, en inglés*. BM-MSC: *MSC derivadas de Médula ósea*. (w): *semana de seguimiento*

En resultados previos a la presente tesis reportamos una tasa de generación de anticuerpos anti-HLA del 17% en el tratamiento con alo-ASC (producto CX611) en pacientes con artritis reumatoide refractarios a al menos a dos terapias biológicas anti-TNF (Álvaro-Gracia, 2017), perteneciente al ensayo en fase Ib/Ila, controlado con placebo. En este estudio los pacientes recibieron de 1 a 4 millones de ASC/kg de peso, repartidas en 3 dosis en los días 1,8 y 15, observando su evolución clínica hasta las 24 semanas. La terapia demostró ser tolerable y aunque se registraron efectos adversos, sólo en 6 pacientes se consideraron severos, no teniendo relación en ningún caso con la generación de anticuerpos anti-HLA. Por lo tanto, queda por demostrar fielmente si la producción de aloanticuerpos influye en la eficacia del tratamiento con MSC. Un ensayo de fase II en la Universidad de Karolinska que investigaba la capacidad de las MSC para tratar la enfermedad injerto contra huésped (GvHD, en sus siglas en inglés) no encontró diferencias en la eficacia entre utilizar MSC idénticas en HLA, haplo-idénticas ó no compatibles con el receptor (Le Blanc 2008). 27 pacientes recibieron una dosis, 22 recibieron dos dosis y 6 de tres a cinco dosis. 30 pacientes tuvieron una respuesta completa y 9 mostraron mejoría. Ningún paciente tuvo efectos secundarios durante o inmediatamente después de las infusiones de MSC. La tasa de respuesta no estuvo relacionada con el grado de compatibilidad HLA (match) del donante. Sin embargo, el grado de supresión inmune a los que son sometidos los pacientes durante un trasplante

de médula ósea podría enmascarar los resultados obtenidos entre las MSC HLA idénticas y las no compatibles.

En cualquier caso, las mediciones de los anticuerpos anti-donante en los ensayos clínicos, que hasta la fecha han sido escasas, deben por tanto, convertirse en rutinas, ya que permitirá al campo comprender si existe una relación entre el grado de incompatibilidad HLA, rechazo MSC y eficacia del tratamiento en condiciones específicas.

5.3.- PAPEL DE LOS ADES EN LA TERAPIA ASC

5.3.1.-La presencia de ADES induce respuestas secundarias frente a alo-ASC

Una variante interesante en el estudio mencionado de la Universidad de Karolinska es la administración repetida de MSC alogénicas. En el presente trabajo, hemos comprobado a través de técnicas sensibles que existen individuos presensibilizados. De los 10 pacientes presensibilizados para clase I en el grupo ASC, 2 de ellos con ADES preformados generaron una potente respuesta secundaria a los 3 meses (estos anticuerpos específicos duplicaron su título tras la administración), otros 6 individuos también generaron anticuerpos anti-HLA, pero *de novo* y sólo 2, no manifestaron ningún tipo de respuesta humoral. En ninguno de ellos se presentaron efectos adversos relacionados aunque el mantenimiento de estos anticuerpos a nivel sistémico en aquellos pacientes ADES positivos, se prolongó durante más tiempo con respecto al grupo de pacientes sensibilizados de forma primaria. Los diferentes porcentajes de aclaramiento entre unos y otros al año de la administración (16,6% con respecto al 60% de aclaramiento en pacientes sin anticuerpos anti-HLA previos) al igual que el título encontrado por LSM ponen igualmente de manifiesto la inducción de una respuesta secundaria. No obstante, es necesario recabar un mayor número de pacientes presensibilizados, un seguimiento pormenorizado a diferentes tiempos y evaluar el cambio isotípico de inmunoglobulinas para confirmar con certeza la respuesta primaria/secundaria en la administración de alo-ASC en pacientes sin o con ADES. Un punto que queda sin resolver es si la presencia de ADES preformados, es determinante para la eficacia. De los 2 pacientes presensibilizados y con respuesta de memoria, uno presentó una respuesta clínica favorable al tratamiento en todas las visitas registradas, pero el segundo, aunque a las 12 semanas era favorable, a partir de las 18 semanas reabrió fístulas y no se consiguió un nuevo cierre durante el año de seguimiento. El reconocimiento y rechazo de MSC por anticuerpos anti-HLA, sólo ha podido testarse en modelos animales. Schu y colaboradores, claramente demostraron que ambas, BM-MSC alogénicas, no manipuladas y pretratadas con IFN γ , estimulaban la producción de anticuerpos en ratas lo que se asoció con un acelerado aclaramiento de un inóculo secundario de alo-MSC (Schu, 2013). Tras esta evidencia, demostraron la capacidad de estos anticuerpos para fijar complemento y mediar la lisis de las células donante *in vitro*. Sin embargo, no definían de forma certera la especificidad de los anticuerpos encontrados. Este dato es importante a la hora de valorar a los individuos presensibilizados en base a nuestros resultados, ya que los anticuerpos anti-HLA pueden

representar un biomarcador negativo inespecífico a la terapia o como en el caso del TOS, distinguir entre presensibilizados con ADES o sin ellos, para elegir al donante idóneo en base a la compatibilidad HLA y realizar cruces bien por pruebas cruzadas serológicas y/o virtuales en base a las especificidades anti-HLA que presente el receptor.

5.3.2.- El título de ADES influye en el reconocimiento y citotoxicidad *in vitro*.

Los ADES tanto de clase I como de clase II, representan el mayor riesgo en el rechazo del injerto alogénico a través de la citotoxicidad dependiente de la activación del complemento (CDC) y la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC). Los mecanismos de alo-reconocimiento/rechazo de alo-ASC no han sido completamente estudiados, y a pesar de su estado inmunoprivilegiado, tanto las alo - y auto-ASC no persisten después de la infusión sistémica, puede que debido a limitaciones como son la deficiencia de nutrientes, falta de adherencia y/o factores de crecimiento (Muschler, 2004); Sin embargo, un mecanismo inmunológico podría ser también responsable de la persistencia limitada de alo-ASC. La presencia de anticuerpos anti-HLA y el reconocimiento de las alo-ASC pueden acelerar su aclaramiento debido a que unen y activan el complemento a través de su región Fc, el cual resulta en CDC e inicia el mecanismo de rechazo humoral (Loupy, 2013). Además, también por su región Fc pueden ser reconocidos por células del sistema inmune innato, como las NK, a través de sus receptores Fc (Resch, 2015).

A pesar de que el ensayo sobre fase sólida basado en Luminex es la técnica estándar para la determinación de anticuerpos anti-HLA en el TOS, la capacidad de unión y citotóxica de estos anticuerpos no puede medirse a través de esta tecnología. Por esta razón diseñamos el ensayo FCXM que nos permitiría determinar el reconocimiento *in vitro* de las ASC y la fuerza de unión de los ADES circulantes. Primeramente usamos dos anticuerpos específicos dirigidos constitutivamente frente a las moléculas HLA de clase I (clon W6/32) y de clase II (clon L243) para asegurarnos la capacidad de interacción con las ASC con independencia del fenotipo HLA celular expresado. W6/32 anti-HLA I, reconoció tanto unASC como ASCy de forma dosis dependiente con un valor de r^2 de 0.78 y 0.93 respectivamente (Figura R6) utilizando una concentración máxima de 15ng/ul en cada caso pero obteniendo un aumento de IMF hasta 15 veces superior en el caso de utilizar ASCy. Es decir, la correspondencia entre título y capacidad de unión es mejor en el caso de utilizar ASC estimuladas, lo que se traduce en que si utilizamos ASC sin preactivar para la administración, el reconocimiento por ADES circulantes será menor que si las utilizamos preactivadas en el caso de anticuerpos anti-HLA de clase I.

Con L243, no obtuvimos ningún tipo de señal en el caso de utilizar unASC, como ya se ha descrito, no presentan moléculas HLA de clase II en su membrana, sin embargo al utilizar ASCy encontramos igualmente una respuesta dosis dependiente con un valor de r^2 de 0.93 (Figura R6) saturándose a una concentración máxima de 3 ng/ul, mucho menor que con el reconocimiento para clase I y obteniendo un aumento de IMF muy discreto con respecto al

control. Es decir, la densidad antigénica está en relación directa con la intensidad de señal encontrada. Estos resultados se traducen en que si somos capaces de controlar la inducción de clase II en ASC administradas sin preactivar, no será necesario valorar ADES del receptor ni moléculas HLA del donante en el caso de clase II, ya que no serán relevantes puesto que no tendrán diana a la que dirigirse.

Asegurada la capacidad de fijación de anticuerpos sobre la membrana de las ASC, nos dispusimos a testar cada una de las muestras de los pacientes de la cohorte. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la fijación de anti-IgG depende claramente de los anticuerpos anti-HLA ya que sólo obtuvimos un incremento de IMF en aquellas muestras igualmente positivas por LSM. Además, como ya habíamos deducido, se conseguía mayor IMF cuando las ASC estaban preactivadas, siendo nuevamente dependiente de la densidad antigénica en membrana. Finalmente, el análisis por curvas ROC, nos indicó que la correspondencia entre la tecnología Luminex y el FCXM es mejor al utilizar ASC γ (AUC: 0.96).

Nuestros resultados no han podido reproducir la citotoxicidad encontrada por el grupo de Al-Daccak, quien reporta igualmente una dependencia lineal entre el título de ADES y el incremento de IMF por FCXM, pero encontrando además, correspondencia con el nivel de muerte celular medida como aumento en el porcentaje de 7AAD (Hocine, 2017). Este grupo trabaja sobre la influencia de los anticuerpos anti-HLA sobre CPC (células progenitoras cardíacas) *in vitro*. En este estudio, utilizaban sueros de pacientes sensibilizados (pero no bajo administración de CPC) en lista de espera de trasplante cardíaco y encontraban un porcentaje de lisis utilizando CPC sin y con preactivación de IFN γ , utilizando sueros con títulos medios/altos frente a CPC preactivadas o sueros con títulos muy altos al utilizar CPC sin estimular, en donde conseguían un 80% y 40% respectivamente de lisis celular. El hecho de que hayamos conseguido un porcentaje hasta el 40%, pero sólo en el caso de utilizar ASC γ con dos sueros de títulos anti-HLA muy altos, es indicativo de que los anticuerpos anti-HLA generados por la terapia ASC también pueden ser citotóxicos, sin embargo, barajamos la posibilidad de que existen mecanismos reguladores y señales de supervivencia dependientes de ASC que no permitan la lisis de las mismas en el resto de pacientes.

La determinación de los diferentes subtipos de Inmunoglobulinas (Ig) generadas podría definir la capacidad intrínseca de los anticuerpos, como ha sido descrito recientemente en un modelo de ratón tras una inyección intramuscular de alo-MSc en un modelo de isquemia (Alagesan, 2018), en donde encuentran que a pesar de que sí se producen Ig del subtipo IgG1, hay una falta de producción de IgG3, ambas implicadas en el reconocimiento por el sistema de complemento.

No obstante, un mecanismo de inhibición por parte de las ASC del sistema de complemento parece ser el responsable de la falta de lisis por CDC. Se ha propuesto que las MSC son negativas para MCP (CD46), y DAF (CD55) pero sí expresan otros reguladores de

complemento como protectina (CD59) (Moll, 2011) y en una proporción mayor de lo que lo hacen los PBMC (Jia, 2016). El estudio de Jia, introduce una hipótesis interesante, ya que para compara el FcTox de las ASC de origen de rata con PBMC de la misma especie frente a sueros humanos. Sólo que en lugar de evaluar los antígenos HLA, las ASC y PBMCs de rata expresan el xenoantígeno α -GAL y el suero en humanos contiene anticuerpos anti- α -GAL. En cualquier caso, demuestran cómo a pesar de provenir del mismo donante y conseguir intensidades de fijación similares, la capacidad de lisis por anticuerpos es menor en ASC que en los PMBC debido a su mayor expresión de proteínas reguladoras del complemento como CD59.

Con respecto a otras fuentes de células mesenquimales, las ASC parecen poseer mayor resistencia a la ADCC (Roemeling-van Rhijn,2013). Al cocultivar linfocitos T CD8+ con ASC o BM-MSC (MSC de médula ósea) puede imprimirse un potencial efector de los linfocitos frente a estas células. En esta hipótesis se basó el estudio de Roemeling-van Rhijn en 2013, en el que probaron hasta 5 combinaciones de PBMC con donantes ASC y BM-MSC incompatibles como mínimo para 2 antígenos HLA (figura D1).

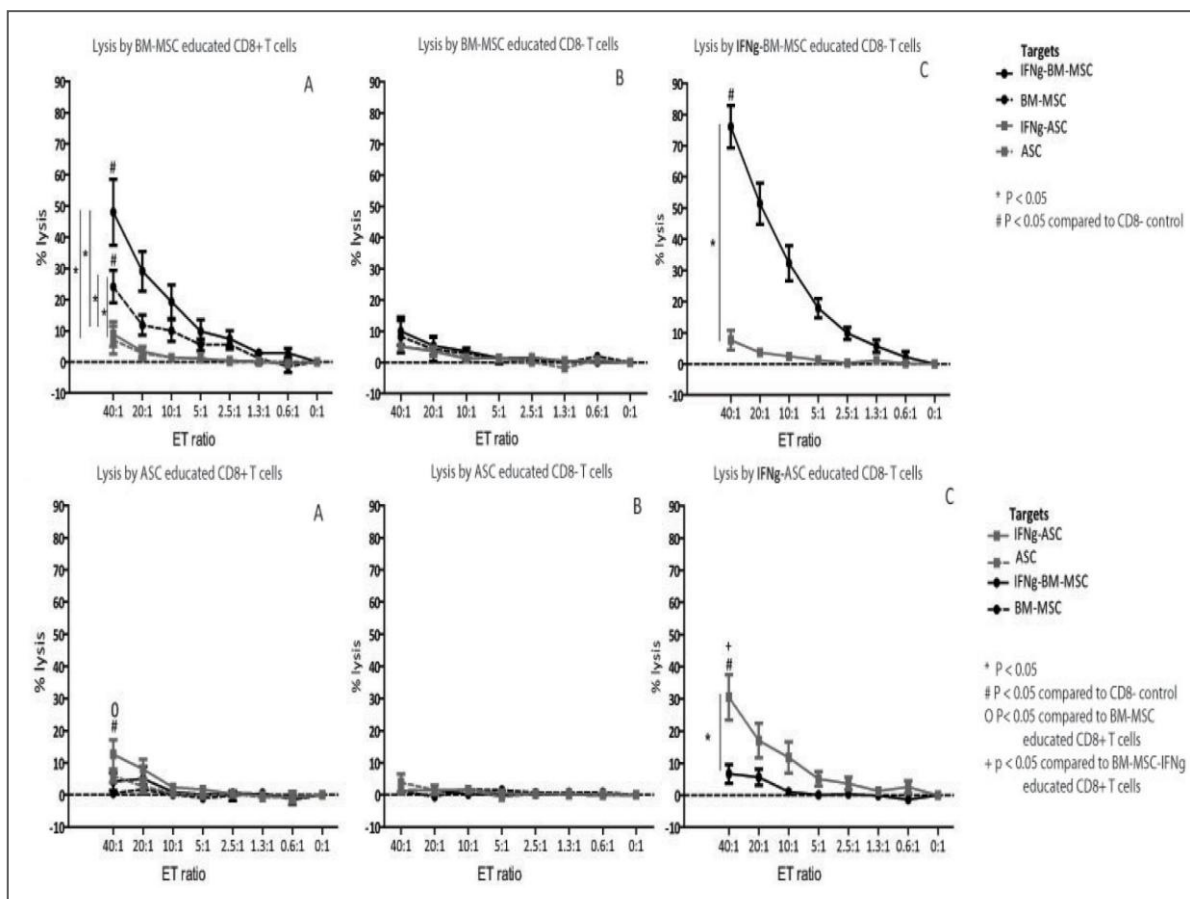


Figura D1: Lisis dosis dependiente y específica de BM-MSC y ASC por linfocitos T CD8+ efectores expuestos con anterioridad a cada una de las fuentes de células mesenquimales. Adaptado de Roemeling-van Rhijn,2013

Sus resultados demuestran cómo a pesar de la capacidad de ambas fuentes en generar una respuesta celular efectora, en el contacto repetido, sólo las BM-MSC eran susceptibles a la lisis por linfocitos T CD8+ efectores sin preactivación (bajos niveles de HLA) Aunque la expresión de HLA tras inducción con IFN γ se conseguía prácticamente por igual en ambas fuentes, la lisis era mucho mayor en BM-MSC que en ASC.

En resumen, aunque las MSC no pueden considerarse verdaderamente inmuno privilegiadas, es un hecho que el rechazo de las alo-ASCs ocurre en menor grado que el rechazo de otros tipos de células alogénicas (Zangi, 2009). El momento y la gravedad del rechazo de ASC son conceptos a dilucidar pero parecen ser fuertemente dependientes del contexto inflamatorio. Sin embargo, para que lleven a cabo sus capacidades inmunomoduladoras necesitan de este contexto (Stagg, 2006. delaRosa 2009, Mancheño-Corvo, 2015) Por lo tanto, la eficacia terapéutica necesitará de un equilibrio entre la expresión de factores inmunogénicos e inmunosupresores en las ASC.

Dado que el control en la inducción de moléculas en superficie *in vivo* es un reto al que enfrentarse, posiblemente dependiente de múltiples mecanismos fisiológicos así como de variabilidad individual, una manera de atajar el reconocimiento de ASC por parte de los ADES con independencia de la densidad antigénica HLA es realizar cruces donante/receptor. De forma añadida, al contar con pacientes presensibilizados en el estudio, hemos podido caracterizar esta fijación de anticuerpos como específica, ya que a pesar de existir muestras con un cPRA cercano al 80% sólo obteníamos incremento de IMF en aquellos pacientes con un score diferente a 0, es decir, aquellos que presentaran ADES preformados frente a las moléculas HLA de ASC. No obstante, los resultados confirman una unión dosis dependiente en base al título de anticuerpos encontrado por tecnología Luminex, dado que aquellos pacientes con IMF más altas por LSM presentaban igualmente IMF más altas por FCXM, siempre que sus especificidades fueran dirigidas frente al antígeno ASC. Sin embargo, si el título de ADES era bajo, no obteníamos un incremento significativo con respecto al control. Es decir, el hecho de presentar ADES, no implica consecuentemente el reconocimiento de ASC, sino que el título en el que los presente también es dependiente de su reconocimiento *in vitro*, sin embargo, el potencial riesgo de estos anticuerpos debe de contemplarse en todos los casos, dado que como hemos visto, se desarrollan respuestas inmunes de memoria.

Estos resultados ponen de manifiesto que la propuesta inicial en 1998 por Klyushnenkova de la generación de una gran oferta de MSC alogénicas de un donante universal en cultivo y utilizarse para tratar a todos los pacientes (Klyushnenkova, 1998), debe revisarse y considerar un potencial banco de ASC que permita estudiar diferentes variantes de donantes en diferentes cohortes de individuos presensibilizados, con el fin de definir y contrastar el verdadero riesgo/beneficio que implica la presencia de anticuerpos anti-HLA previos y su fijación a las ASC con su verdadero potencial terapéutico. En el TOS, un enfoque para eludir la incompatibilidad del injerto con

respecto a las sensibilizaciones en el donante es minimizar las diferencias alogénicas entre el donante y el receptor mediante la correspondencia HLA. En última instancia, se deben realizar trasplantes HLA-A, -B, -DR, -DQ compatibles. Incluso considerar la existencia de otros loci de histocompatibilidad importantes, como HLA-C o -DP. Esto es extremadamente difícil de lograr debido al polimorfismo extremo de estos antígenos y a la disponibilidad limitada de donantes totalmente compatibles. En el contexto de la terapia ASC, es evidente que sería igualmente difícil. Por lo tanto, es necesario recabar más datos en pacientes presensibilizados para apuntar el banco de ASC como la única opción.

5.4.-ESTRATEGIAS PARA MINIMIZAR LA INMUNOGENICIDAD DE ASC

Con los resultados obtenidos en las pruebas con FCXM, hemos observado la correspondencia de las distintas especificidades para los locus A y B, no así con el locus C, un antígeno HLA de membrana, de baja expresión. Es por ello relevante señalar, que si la coincidencia HLA completa no siempre es posible, la estrategia sería definir aquellas incompatibilidades más o menos inmunogénicas. HLA-Matchmaker es un programa de emparejamiento estructural que considera cada antígeno HLA como una cadena de epítomos representados por secuencias cortas (epletas) que implican residuos de aminoácidos polimórficos en posiciones accesibles a anticuerpos (Duquesnoy 2002). Determina qué residuos son diferentes entre el donante y el receptor y determina la aceptabilidad del desajuste HLA. Sin embargo, dada la escasez de cruces con una coincidencia perfecta, el reto más bien ha sido identificar los anticuerpos anti-HLA clínicamente relevantes; los que provocan el rechazo, es decir, los considerados anticuerpos prohibidos porque reconocen epítomos presentes en el injerto y no en el receptor. Otro enfoque es realizar cálculos de energía de interacción del contacto entre el TCR y los residuos de HLA. Tal enfoque también podría predecir el desarrollo futuro de la(s) reacción(es) inmune(s) y, en consecuencia, el resultado del injerto alogénico (Dudkiewicz, 2009). No obstante, dado que las pruebas reales solo pueden predecir un riesgo teórico de rechazo, la dificultad persiste. Sin embargo, tanto el ensayo sobre fase sólida como FCXM para los anticuerpos HLA juegan un papel clave y son ampliamente utilizados por los programas de trasplante en todo el mundo. Aunque no existen estándares rígidos para su uso e interpretación, los pacientes trasplantados se están beneficiando del uso de estas pruebas y de lo cual los pacientes en los que la terapia ASC esté indicada deberían beneficiarse igualmente.

5.4.1.- Ajuste de la compatibilidad HLA ASC/paciente

La sensibilización del paciente es un efecto no deseado; su caracterización como paciente sensibilizado en el caso de requerir un injerto de órgano sólido supone que se expondrá a una mayor dificultad clínica para encontrar un donante adecuado. Por tanto

sería deseable poder controlar las respuestas humorales que puedan generar las alo-ASC ante la necesidad de más administraciones en pacientes no sensibilizados al inicio.

El grado de compatibilidad HLA entre el producto celular y el receptor, ha sido cuantificado en base al número de residuos polimórficos de cada locus HLA presentes en el donante y ausentes en el receptor, número de incompatibilidades o *mismatched (MM) eplets*. Duquesnoy ya introdujo que existe una correlación entre la producción de anticuerpos anti-HLA y el número de MM *eplets*. En aquella ocasión reportó además que la tasa de generación de anticuerpos para el mismo número de MM era superior en el trasplante de órgano sólido que en el embarazo (figura D2).

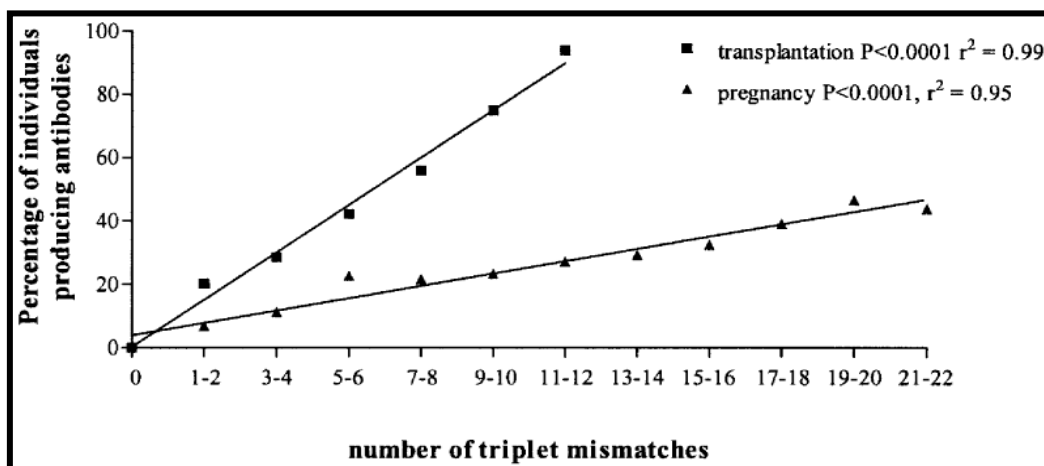


Figura D2: Porcentaje de individuos que generan anticuerpos anti-HLA en relación al número de incompatibilidades con el sujeto donante, medido en trasplante de órgano sólido y embarazo. Adaptado de Dankers, 2004.

Recientemente, se ha publicado la influencia de la incompatibilidad HLA en el trasplante de riñón de donante vivo, en donde las complicaciones asociadas al estado del donante y la isquemia-reperfusión desaparecen, por tanto, es un sistema más limpio para valorar la influencia de la compatibilidad HLA en el rechazo del injerto, al igual que sucede con las ASC. El estudio encontró una relación lineal entre la falta de compatibilidad (*HLA-match*) a nivel de antígeno (HLA-A, -B o -DR) y la supervivencia del aloinjerto (Williams, 2017). Entre todos los donantes vivos estudiados, 1 diferencia confiere un 44% de mayor riesgo de rechazo que con un donante totalmente compatible, mientras que 6 diferencias duplicaban este valor.

En el presente trabajo, siguiendo el modelo de Dankers, la tasa se ha situado en un nivel intermedio entre la sensibilización por TOS y embarazo. El grado de correlación obtenido (r^2 : 0.51, teniendo en cuenta locus A y B) hace necesario incluir muchos más pacientes en el estudio, pero deja entrever, sobre todo en los grupos extremos una relación directa lineal entre ambos parámetros. Por tanto, aquellos pacientes con un tipaje HLA más diferente al del producto alogénico tendrán una mayor probabilidad de generar anticuerpos y dado que no se ha encontrado una relación clara entre la eficacia terapéutica con el grado de compatibilidad HLA (ver figura R14B), podemos sugerir el

contar por tanto con una variedad de ASC procedentes de distintos donantes para elegir al más compatible e intentar reducir la generación de anticuerpos anti-HLA. Estos resultados apoyan los reportados por otro grupo español (García-Sancho, 2017) en el tratamiento de la osteoartritis y enfermedad de disco degenerativa, en donde evaluaban la compatibilidad HLA como número de diferencias a nivel de antígeno, es decir, de 0 (loci A,B,DRB1 idénticos) a 6 (los 3 loci diferentes). En este trabajo, elaborado con una cohorte de 23 pacientes entre los dos ensayos tratados con MSC de médula ósea alogénicas, no encontraron diferencias entre cada nivel de incompatibilidades y la eficacia obtenida, aunque pudieron ajustar una línea de tendencia para el grupo de osteoartritis, en el que la eficacia era mayor en pacientes con más de 4 antígenos diferentes, no resultó significativa. Por tanto, la evaluación de la eficacia con respecto a la compatibilidad HLA puede resultar controvertida y requiere su comprobación en cada protocolo terapéutico.

Ante la propuesta de reducir la generación de anticuerpos anti-HLA tras una administración de alo-ASC un enfoque sería el desarrollo de bancos de células con compatibilidad HLA. Al conocer la extrema diversidad del sistema HLA con un número cada vez mayor de alelos descritos (más de 7000 en la actualidad), no es realista considerar el desarrollo de una fuente HLA de células mesenquimales totalmente combinada cuando el programa nacional del Registro de donantes de médula ósea (REDMO) incluye actualmente más de 350.000 donantes de médula ósea tipificados y cubren solo una fracción de la diversidad humana HLA española (<http://www.fcarreras.org/es/redmo>). Aunque no se puede obtener una célula donadora totalmente compatible, existe la posibilidad de seleccionar un repertorio de células donantes compatibles con HLA en función de la frecuencia de los haplotipos HLA. El tamaño y el contenido óptimo de dicho banco de ASC se calcularía en base a las frecuencias de haplotipos HLA entre los pacientes por ejemplo, con enfermedad de Crohn. Los programas de simulación y los modelos matemáticos serán útiles en el diseño de dichos bancos celulares para que sean económicamente sostenibles. A este respecto, se ha propuesto derivar ESC e iPSC desde un panel restringido de haplotipos HLA, el uso de donantes HLA-A, -B y -DR homocigotos puede limitar en ese caso a menos de 100 la cantidad de haplotipos que se requieren para la mayor parte de una población heterogénea con el mismo origen étnico (Gourraud, 2012). Con esta idea, se llevó a cabo un modelo de constitución de un haplobanco de iPSC en California. El modelo incluyó la coincidencia a nivel de haplotipo y a nivel de genotipo entre el hipotético haplobanco iPSC y la población receptora. Mostraron que para servir a la población simulada de California a través del emparejamiento por haplotipo requeriría la creación, almacenamiento y el mantenimiento de casi 207 haplótipos diferentes que representen los 60 haplotipos más frecuentes de cada grupo de ascendencia. Las tolerancias con el emparejamiento por genotipo, reducían el haplobanco y finalmente proporcionó una base para construir bancos celulares de menos de 80 líneas que podrían satisfacer las necesidades de la mayoría (> 50%) de la población de California. La constitución de bancos de donantes haploidénticos y homocigotos entre grandes grupos étnicos definidos por sus

antecedentes es relevante para el desarrollo de la terapia celular inmunomoduladora. No obstante, existe una gran cantidad de literatura que subraya las limitaciones de la compatibilidad HLA en el trasplante y se sabe que los determinantes genéticos no HLA también confieren riesgo de rechazo. Dependiendo de las opciones terapéuticas y donantes alternativos, varios niveles de compatibilidad pueden estar justificados. Pero integrar el panorama inmunológico del paciente con la inmunobiología conocida de ASC será la clave para garantizar la aplicación exitosa de este tipo de terapias en la clínica con el fin de que la alogenicidad tenga el menor impacto posible sobre la eficacia. Todo ello ayudará a caracterizar de una forma certera que la generación de anticuerpos anti-HLA podría ser una consecuencia de reconocimiento tardío tras la lisis de las ASC, o bien, que la fijación de los anticuerpos anti-HLA del receptor sobre las ASC no influyen sobre su capacidad total para conseguir una modulación. El objetivo es dar una información contrastada al clínico de que este riesgo puede existir, pero el beneficio real que puede conseguirse en las fístulas de la enfermedad de Crohn prevalece. En cualquier caso, no debe ser un parámetro a ignorar como lo ha sido en la mayoría de los ensayos registrados.

5.4.2.- Terapia ASC combinada con bloqueantes del TNF e inmunomoduladores.

Mientras que en el TOS, la inmunosupresión es incuestionable para la permanencia del órgano alogénico, en la terapia con ASC la inmunosupresión como mediadora de la alogenicidad no suele contemplarse en los ensayos clínicos en desarrollo. Además, como postulan muchos de sus exportadores, su principal mecanismo de acción es de *hit and run*, es decir, una vez administradas, modulan el ambiente inflamatorio de la lesión y desaparecen al cabo de 72 horas. En cualquier caso, algunos en los pacientes de la presente trabajo mantuvieron las dosis de inmunomoduladores del tipo metotrexato o azatioprina; otros, anti-TNF, ambos, medicamentos recogidos en los protocolos terapéuticos para la enfermedad de Crohn tras la administración de ASC. Entre los resultados de esta tesis se ha reportado cómo este tipo de terapias ha podido influir en la generación o no de anticuerpos anti-HLA, observando que aquellos pacientes que tomaron ambos tipos de medicamentos de forma combinada presentaron la menor tasa de generación de anticuerpos anti-HLA (15,8% de los pacientes), el resto de pacientes que al inicio del ensayo tomaron sólo anti-TNF ó no tenían terapia asociada a las ASC, tuvieron tasas de generación de anticuerpos anti-HLA por encima del 40%, incluso el 71,5% de los pacientes que tomaron inmunomoduladores generaron una respuesta humoral. No podemos afirmar que la administración de alo-ASC en combinación con anti-TNF e inmunomoduladores reduzca la capacidad del sistema inmune del individuo receptor para generar anticuerpos anti-donante, sobretodo porque como se recoge a lo largo del presente trabajo, son muchas las variables que han podido condicionar una respuesta humoral y la detección sistémica de anticuerpos anti-HLA es el punto final de dicho proceso. Sin embargo, existen grupos que en la terapia con anti-TNF en enfermedades

autoinflamatorias como la artritis reumatoide, ya han reportado un bloqueo de las respuestas primarias T dependientes, posiblemente por interferir en la reacción de centro germinal, en donde no observaban aumento en los títulos de anticuerpos específicos tras la vacunación frente a hepatitis B (Salinas, 2013) y también gripe (Kobie, 2011) en individuos tratados con bloqueantes del TNF, mientras que no había diferencias en la vacunación frente a polisacáridos de pneumococo (respuesta T independiente) con respecto al grupo control.

De probarse estos resultados en cohortes más amplias, la combinación de la terapia ASC con bloqueantes del TNF e inmunomoduladores, no sólo sería una forma de truncar la respuesta humoral frente a las ASC, sino, como se ha reportado en los resultados del presente ensayo clínico (Figura D3) incrementar aún más la eficacia de remisión combinada con respecto al grupo placebo que la combinación de ASC con cada agente de forma individualizada.

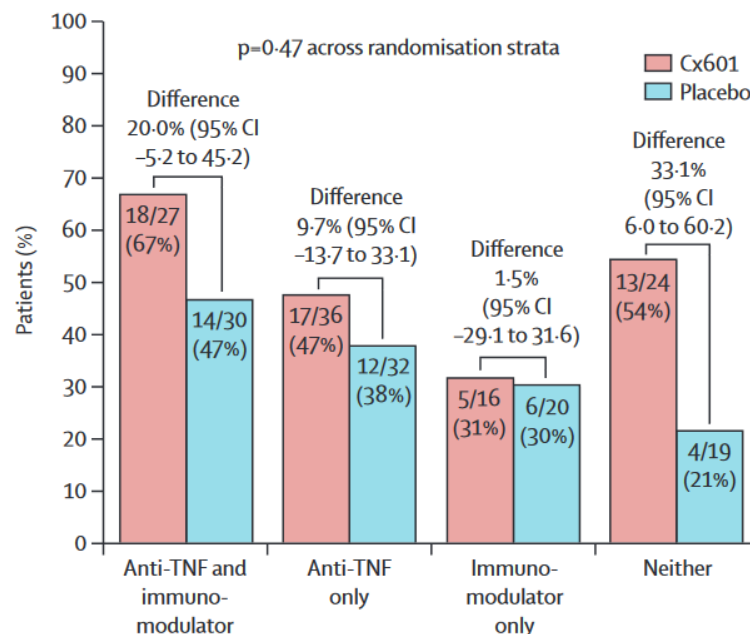


Figura D3: Porcentaje de pacientes con remisión clínica combinada acorde a la estratificación según el tratamiento indicado en el momento de la inclusión en el ensayo clínico. Adaptado de Panés, 2016.

Bajo la misma afirmación, la terapia combinada ASC/inmumoduladores resulta la menos efectiva en el bloqueo de la respuesta anti-HLA y en base a los resultados del ensayo clínico en fase III, la administración de ASC en estos casos, no aporta apenas beneficio con respecto al grupo placebo. Posteriores estudios requerirán la influencia de los inmunomoduladores sobre el mecanismo de acción de las ASC.

5.4.3.-Determinación de biomarcadores inmunológicos predictivos de respuesta anti-HLA

Otro aspecto que ha sido analizado, es la relación entre el inmunofenotipo de sangre periférica de los pacientes al inicio de la terapia y la generación o no de anticuerpos anti-HLA, apartado en el que no se han encontrado evidencias claras ni significativas como para distinguir un biomarcador que nos identifique qué individuos van a ser más proclives a generar una respuesta humoral, a excepción de una relación existente entre un mayor número inicial de monocitos intermedios y no clásicos (pro-I y pro-II) con el grupo productor de anticuerpos anti-HLA. Debemos plantearnos la pregunta de si este hecho es casual o determina realmente una mayor predisposición en estos individuos a generar anticuerpos anti-HLA. Mientras la patogénesis del rechazo alógeno en trasplante de órgano sólido a través de linfocitos T está muy bien documentada y centrada en el sistema inmune adaptativo, el sistema monocito-macrófago también ha sido reconocido como integrante de los procesos de lesión por isquemia-reperfusión, rechazo agudo y rechazo crónico (Auffray, 2009). Tradicionalmente se ha considerado a estas células como contribuidores del proceso mediado por células T dentro del rechazo agudo, siendo reclutadas bajo la influencia de las citocinas para promover la inflamación y actuar como células presentadoras de antígeno (Chadban, 2010). De acuerdo con la bibliografía actual el sistema monocito-macrófago es fenotípicamente plástico y puede dirigir su función según el microambiente en el cual ellos residan. La clasificación más clásica, descrita por Geissmann en 2003 de fenotipo M1 (pro-inflamatorio) y M2 (resolución y reparación tras el proceso inflamatorio) (Geissmann, 2003) fue ampliada más tarde por Wong y col. de acuerdo a su perfil génico, fenotipo y expresión de citocinas definiendo un estado intermedio entre los dos anteriores (Wong, 2011). Describieron por tanto, 3 tipos de monocitos, clásicos, intermedios (pro-I) y no clásicos (pro-II). Los monocitos intermedios presentaron el mayor nivel de expresión en los genes de HLA-DR y CD40L, requeridos para la presentación antigénica y coestimulación T respectivamente. El hecho de que haya un número mayor y significativo de monocitos pro-I en los individuos con generación de anti-ASC con respecto a individuos sin anticuerpos anti-ASC y el grupo placebo es indicativo que han sido relevantes. Los monocitos pro-II también estaban aumentados al inicio de la terapia en el grupo productor de ADES y en el TOS, la polarización M2 se ha asociado con una lesión glomerular crónica en el caso del trasplante renal (Kim, 2018). No obstante, son resultados muy preliminares y que requieren de una profunda investigación.

Otro de los objetivos perseguidos, una vez se ha descrito una respuesta humoral, es conocer su efecto y por tanto su relación con las variaciones observadas en las poblaciones inmunes y moléculas solubles antes y después de la administración de alo-ASC, para ello, analizamos igualmente el inmunofenotipo en sangre periférica, a los 3 meses post-administración y comparamos las variaciones existentes con respecto al

inicio, no observando diferencias significativas entre pacientes placebo y ASC con y sin respuesta humoral. En cambio, sí observamos cómo en el grupo de pacientes que generan anticuerpos anti-HLA hay una reducción en la concentración de sus linfocitos en cultivo de las citocinas IFN γ , IL1beta e IL17a, todas ellas, citocinas responsables de respuestas Th1 y Th17. También hemos encontrado una reducción significativa en los porcentajes intracelulares de IL10 en linfocitos de pacientes que han generado anticuerpos, es decir, su perfil tolerogénico ha sido menor que en pacientes sin respuesta humoral y placebo. Aunque pueda resultar contradictorio, indicaría un desbalance hacia una respuesta Th2, propia de respuestas humorales, sin embargo, de las citocinas implicadas en esta vía, sólo pudo medirse la IL4 y en esta ocasión no ha revelado diferencias significativas entre grupos. Estos resultados hacen necesario una validación en cohortes más amplias.

5.5.-PROPUESTA DE MONITORIZACIÓN INMUNOLÓGICA PARA FUTURAS ADMINISTRACIONES

El seguimiento realizado hasta la semana 52 pone de manifiesto la evaluación favorable tras la administración de Cx601. De particular importancia es el hecho de que no hubo nuevos efectos adversos asociados al tratamiento (TEAE) tras las 24 semanas como primer punto de validación. En general, un porcentaje similar de pacientes en ambos grupos (placebo y alo-ASC) experimentó TEAE durante el año de seguimiento (Panés, 2018). La tolerabilidad favorable y ausencia de TEAE relacionados, puede deberse a la aplicación local del tratamiento y contrasta con otras terapias médicas sistémicas utilizadas para manejar la enfermedad de Crohn fistulizante. En cuanto a la sensibilización HLA en los pacientes tratados, no cabe duda de que es un inconveniente ante la probabilidad de que puedan necesitar un trasplante de órgano sólido en el futuro; pero el riesgo/beneficio en este caso es muy bajo, dado que la respuesta clínica encontrada y mantenida durante 1 año de seguimiento sugiere la necesidad de reducir las intervenciones quirúrgicas mayores en estos pacientes, en los que actualmente el 38% de ellos requieren de estos procedimientos, entre los que se encuentra una colostomía o estoma, que perjudica en alto grado su calidad de vida.

La comprobación con nuestros resultados pone de manifiesto que al menos para el grupo de pacientes sin sensibilización previa, una dosis es segura y además sugiere que el reconocimiento alogénico primario no es necesario para proporcionar una mayor eficacia clínica. Los porcentajes de eficacia encontrados en individuos no sensibilizados tras la administración y en aquellos que generan de forma primaria anticuerpos anti-HLA resultan muy similares (63% y 75% respectivamente, en la semana 24; y 72,7% y 77,3% respectivamente, en la semana 52). Es decir, un paciente con Enfermedad de Crohn fistulizante al que se le administre una infusión de alo-ASC tendría las mismas

probabilidades de conseguir un cierre de fístulas sin generar anticuerpos anti-ASC que otro paciente que sí los generase, o lo que es lo mismo, no sería necesario evaluar la compatibilidad HLA entre receptor y producto alogénico celular de forma previa para conseguir una respuesta clínica favorable. No obstante, sería conveniente validar estos resultados en cohortes más amplias y con el uso de varios donantes, no sólo con el fin de confirmar esta afirmación, sino porque ayudará a entender el mecanismo de acción inmunomodulador de las células mesenquimales y el potencial aclaramiento de las mismas por parte del paciente. Hay que señalar, que el uso de ASC HLA homocigotas evitaría incompatibilidades extremas, como ha sido el caso del paciente 92 en este trabajo (con 37 eplets diferentes con el producto celular), y que generó una potente respuesta humoral, con FcTox positivo confirmado *in vitro* y sin respuesta clínica en ninguna de las visitas. El hecho de contar con 1 sólo paciente de estas características no nos permite deducir que ambos resultados estén relacionados, pero refuerza aún más la propuesta de que se continúe con la monitorización inmunológica en este tipo de terapias para la correcta validación.

Otro aspecto distinto, es el tiempo de beneficio a largo plazo que se consigue con una única administración de 120 millones de ASC (dosis utilizada en el presente ensayo clínico) y si habría necesidad de posteriores administraciones.

Hemos observado, como los pacientes que presentan de forma previa anticuerpos anti-HLA no consiguen la misma tasa de respuesta clínica encontrada en los dos grupos anteriores, independientemente de que sus especificidades estuvieran dirigidas frente al donante o no, de hecho se consiguen tasas similares al grupo placebo. Ha sido el grupo con menor número de pacientes (4 evaluados a semana 52, el 50% con cierre de fístulas) y las conclusiones que puedan derivarse son inevitablemente insuficientes, de confirmarse estos resultados en futuros estudios sí que se haría necesario incluir de forma previa a la administración con alo-ASC una determinación de la presencia de anticuerpos anti-HLA en el suero de los pacientes de la misma forma que se les realiza un estudio pormenorizado de otros parámetros como la resonancia magnética pélvica. De las conclusiones que se derivaran de esos estudios se podría indicar que el resultado positivo en la búsqueda de anticuerpos anti-HLA sería determinante para utilizar, bien un producto alo-ASC con XM negativo (pacientes presensibilizados pero ADES preformados negativos, si generan anticuerpos anti-HLA posteriores a la terapia, lo hacen de forma primaria), una dosis más alta de alo-ASC (si hay reconocimiento alogénico, el porcentaje de lisis según nuestros resultados es relativamente bajo) o bien, puede que como resultados preliminares, finalmente no exista una relación real entre presentar anticuerpos anti-HLA y responder en menor grado y no se haga necesario tomar precauciones en este aspecto, pero una vez más, el manejo de pacientes presensibilizados en este tipo de terapias requiere validación a través de una monitorización inmunológica.

Si por el contrario, el presentar anticuerpos anti-HLA previos se relaciona como factor pronóstico negativo en la intervención con células mesenquimales inmunomoduladoras alogénicas, significaría que los pacientes presensibilizados no podrían beneficiarse de este tipo de terapias. Por lo tanto, se haría necesario minimizar la alogenicidad de las mismas con el fin de que no se generen anticuerpos anti-HLA en individuos no sensibilizados ante futuras administraciones posteriores, propuestas que han sido discutidas en el punto 5.4 de este capítulo.

Una última cuestión que queda por aclarar es la relación entre anticuerpos anti-MICA y la enfermedad de Crohn. A pesar de no contar con una muestra lo suficientemente amplia para conseguir resultados significativos, los resultados indican que no están relacionados con la administración de alo-ASC, ya que la presencia y generación de los mismos ha resultado comparable entre el grupo ASC y el grupo placebo. No obstante, sí que parece estar relacionado con un índice de actividad de la enfermedad más severo, resultados que aunque no arrojan diferencias significativas, sí debieran testarse en futuros estudios para complementar los actuales índices de actividad aceptados, centrados en su mayoría en signos clínicos.

Por lo tanto, para confirmar las cuestiones lanzadas tras la conclusión de este trabajo, consideramos necesario proponer un algoritmo de monitorización HLA a seguir en la enfermedad de Crohn fistulizante, con el fin de validar los resultados expuestos en un grupo de pacientes más amplio y heterogéneo que sería el siguiente:

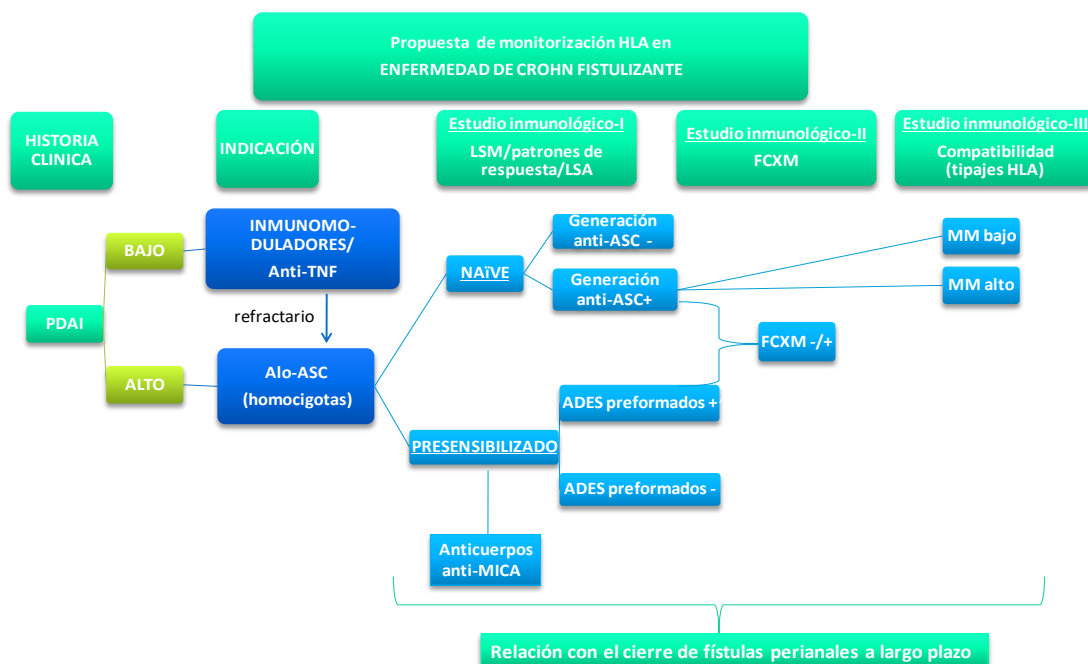


Figura D5: Propuesta de monitorización HLA en los pacientes susceptibles de ser tratados con CX601. En él se recogerían datos clínicos previos (PDAI: *perianal disease activity index*) y tras la administración de alo-ASC, se relacionarían con la presencia y generación de anti-HLA así como las diferencias antigénicas a nivel de locus HLA. MM: *mismatch*, FCXM: *flow cytometry crossmatch*.

El hecho de que se consigan porcentajes de eficacia distintos tan solo filtrando los resultados del cierre de fístulas en base a la sensibilización anti-HLA, sobre todo en el caso de contar o no con pacientes presensibilizados (los no sensibilizados y los sensibilizados de forma primaria muestran un porcentaje similar); justifica en gran medida este algoritmo, pues potencia aún más la eficacia de las ASC y el beneficio que los pacientes con Enfermedad de Crohn fistulizante pueden conseguir como alternativa a la cirugía.

CONCLUSIONES

La terapia inmunomoduladora con alo-ASC en la enfermedad de Crohn fistulizante, supone un gran avance terapéutico, sobre todo para aquellos pacientes en los que la cirugía representa su última opción. Para ellos, a quienes el tratamiento quirúrgico suele suponer una mejora sólo a corto plazo, la terapia celular ha surgido como opción a prolongar esta mejoría.

- 1.- En los desarrollos clínicos en humanos, principalmente enfocados al estudio de la seguridad y eficacia terapéutica del tratamiento, pocas veces se incluye un estudio exhaustivo sobre histocompatibilidad, aspecto de especial relevancia a la hora de discriminar la respuesta clínica del total de la cohorte.
- 2.- La tecnología Luminex es una herramienta útil y muy sensible para detectar anticuerpos anti-HLA generados en la terapia celular alogénica. La tecnología FCXM también detecta anticuerpos anti-HLA, pero con menor sensibilidad que Luminex. Ambas guardan una correlación lineal, más significativa cuando las ASC están preactivadas.
- 3.- El 36,2% de los pacientes tratados en el presente estudio generaron anticuerpos anti-HLA, sólo dirigidos contra los antígenos de clase I. Las moléculas HLA de clase II en ASC no influyen en la terapia, ni los anticuerpos preexistentes las reconocen, ni se generan anticuerpos frente a estos antígenos.
- 4.- Los presensibilizados con ADES generan respuestas de memoria, incrementando sus títulos de forma potente y manteniéndose en circulación durante más tiempo, no consiguiendo como sí sucede en los individuos con respuestas primarias el aclaramiento encontrado al año de seguimiento.
- 5.- El Fctox nos indica que los anticuerpos anti-HLA generados se fijan a los antígenos de ASC en conformación nativa. Pero sólo aquellos sueros con un título muy alto son capaces de activar una lisis por el sistema del complemento.
- 6.- Las incompatibilidades HLA con el Donante de ASC, favorecen la generación de anticuerpos (sobre todo aquellas pertenecientes a los locus A y B).
- 7.- La terapia concomitante inicial, influye en la probabilidad de generar una respuesta humoral, siendo la combinación de inmunosupresores y anti-TNF, la opción que ha presentado la menor tasa de producción de anticuerpos.
- 8.- Generar ADES post-administración no implica una menor eficacia del tratamiento, ya que los individuos que han generado una respuesta humoral frente a alo-ASC han respondido de forma tan favorable como aquellos pacientes ADES negativos.
- 9.- Los individuos presensibilizados también pueden beneficiarse con este tipo de terapias alogénicas, sin embargo, son necesarios más estudios y en cohortes mucho más

amplias para determinar de manera eficaz el potencial riesgo de la presencia de anticuerpos de forma previa a la administración.

10.- La propuesta del algoritmo para la monitorización inmunológica, proveerá un estudio pormenorizado que ante una serie de pacientes más amplia permitirá responder a las cuestiones no satisfechas por ese motivo.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas A.K, Lichtman A.H. Inmunología celular y molecular. (5ª Edición, 2004) Elsevier. 563 pag

Alvarez-Márquez A, Aguilera I, Gentil MA, Caro JL, Bernal G, Fernández Alonso J, Acevedo MJ, Cabello V, Wichmann I, Gonzalez-Escribano MF, Núñez-Roldán A. Donor-specific antibodies against HLA, MICA, and GSTT1 in patients with allograft rejection and C4d deposition in renal biopsies. *Transplantation*. 2009 Jan 15;87(1):94-9

Álvaro-Gracia JM, Jover JA, García-Vicuña R, Carreño L, Alonso A, Marsal S, Blanco F, Martínez-Taboada VM, Taylor P, Martín-Martín C, DelaRosa O, Tagarro I, Díaz-González F. Intravenous administration of expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells in refractory rheumatoid arthritis (Cx611): results of a multicentre, dose escalation, randomised, single-blind, placebo-controlled phase Ib/IIa clinical trial. *Ann Rheum Dis*. 2017 Jan;76(1):196-202

Ankrum JA, Ong JF, Karp JM Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nat Biotechnol*. 2014;32:252–260

Aubert V, Venetz JP, Pantaleo G, Pascual M. Low levels of human leukocyte antigen donor-specific antibodies detected by solid phase assay before transplantation are frequently clinically irrelevant. *Hum Immunol*. 2009 Aug;70(8):580-3

Auchincloss H. Jr, Lee R, Shea S, Markowitz JS, Grusby MJ, Glimcher LH. The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993 Apr 15;90(8):3373-7.

Aust L, Devlin B, Foster SJ, Halvorsen YD, Hicok K, du Laney T, Sen A, Willingmyre GD, Gimble JM. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates *Cytotherapy*. 2004;6(1):7-14

Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells, *Annu. Rev. Immunol.* 27 (2009)669-692

Avior Y, Sagi I, Benvenisty N Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016 Mar;17(3):170-82

Bachelet T, Martinez C, Del Bello A, Couzi L, Keiji S, Guidicelli G, Lepreux S, Visentin J, Congy-Jolivet N, Rostaing L, Taupin JL, Kamar N, Merville P. Deleterious Impact of Donor-Specific Anti-HLA Antibodies Toward HLA-Cw and HLA-DP in Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2016 Jan;100(1):159-66

Baranwal AK, Mehra NK Major Histocompatibility Complex Class I Chain-Related A (MICA) Molecules: Relevance in Solid Organ Transplantation Front Immunol. 2017 Feb 28;8:182.

Barberini DJ, Freitas NP, Magnoni MS, Maia L, Listoni AJ, Heckler MC, Sudano MJ, Golim MA, da Cruz Landim-Alvarenga F, Amorim RM Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. Stem Cell Res Ther. 2014 Feb 21;5(1):25

Beggs KJ, Lyubimov A, Borneman JN, Bartholomew A, Moseley A, et al. Immunologic consequences of multiple, high-dose administration of allogeneic mesenchymal stem cells to baboons Cell Transplant, 2006. 15: 711–721.

Biancone L, Bruno S, Deregibus MC, Tetta C, Camussi G Therapeutic potential of Mesenchymal stem cell-derived microvesicles. Nephrol Dial Transplant 2012; 27:3037-3042.

Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. Nature. 1987 Oct 8-14;329(6139):512-8.

Bradley JA, Mowat AM, Bolton EM. Processed MHC class I alloantigen as the stimulus for CD4+ T-cell dependent antibody-mediated graft rejection Immunol Today. 1992 Nov;13(11):434-8.

Briones J, Novelli S, Sierra J. T-cell costimulatory molecules in acute-graft-versus host disease: therapeutic implications. Bone Marrow Res. 2011;2011:976793

Brunet M. Cytokines as predictive biomarkers of alloreactivity. Clin Chim Acta. 2012 Sep 8;413(17-18):1354-8

Cail J, Huang W, Terasaki PI, Everly MJ, Briley KP, Haisch CE, Bolin P, Kendrick WT, Kendrick SA, Morgan C, Harland RC, Rebellato LM. Novel biomarker combination predicts long-term allograft outcome. Clin Transpl. 2013:319-24.

Camp D, Loeffler D, Farrah D, Boreneman JN, LeWitt PA Cellular immune response to intrastrially implanted allogeneic bone marrow stromal cells in a rat model of Parkinson's disease. J Neuroinflammation, 2009. 6: 17

Chadban SJ, Wu H, Hughes J. Macrophages and kidney transplantation Semin. Nephrol. 30(2010)278-289

Chamberlain G, Fox J, Ashton B, et al. review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. Stem Cells. 2007;25:2739-2749

Chan JL, Tang K, Patel A., Bonilla LM, Pierobon N, Ponzio NM, Rameshwar P. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma *Blood*. 2006; 107:4817–4824

Chesneau M, Michel L, Degauque N Brouard S. Regulatory B Cells and Tolerance in Transplantation: From Animal Models to Human *Front Immunol*. 2013; 4: 497

Chinen J, Buckley RH Transplantation immunology: solid organ and bone marrow. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125:S324–S335

Choy MK, Phipps ME MICA polymorphism: biology and importance in immunity and disease. *Trends in molecular medicine*. 2010 Mar;16(3):97-106

Christopeit M, Schendel M, Föll J, Müller LP, Keysser G, Behre G Marked improvement of severe progressive systemic sclerosis after transplantation of mesenchymal stem cells from an allogeneic haploidentical-related donor mediated by ligation of CD137L. *Leukemia*. 2008;22:1062–1064.

Cooke GS, Hill AV. Genetics of susceptibility to human infectious disease *Nat Rev Genet*. 2001 Dec;2(12):967-77.

Cox ST, Stephens HA, Fernando R, Karasu A, Harber M, Howie AJ, Powis S, Zou Y, Stastny P, Madrigal JA, Little AM Major histocompatibility complex class I-related chain A allele mismatching, antibodies, and rejection in renal transplantation *Hum Immunol*. 2011 Oct;72(10):827-34

Crespo M, Pascual M, Tolkoff-Rubin N, et al Acute humoral rejection in renal allograft recipients, I: incidence, serology and clinical characteristics. *Transplantation* 2001, 71:652-658.

Cruz FM, Colbert JD, Merino E, Kriegsman BA, Rock KL. The Biology and Underlying Mechanisms of Cross-Presentation of Exogenous Antigens on MHC-I Molecules. *Annu Rev Immunol*. 2017 Apr 26;35:149-176.

Curigliano G, Criscitiello C, Gelao L, Goldhirsch A. Molecular pathways: human leukocyte antigen G (HLA-G) *Clin Cancer Res*. 2013 Oct 15;19(20):5564-71

Dankers MK, Witvliet MD, Roelen DL, de Lange P, Korfage N, Persijn GG, Duquesnoy R, Doxiadis II, Claas FH. The number of amino acid triplet differences between patient and donor is predictive for the antibody reactivity against mismatched human leukocyte antigens. *Transplantation*. 2004 Apr 27;77(8):1236-9.

Dausset J. Iso-leuko-antibodies. *Acta Haematol*. 1958 Jul-Oct;20(1-4):156-66

de la Portilla F, Alba F, García-Olmo D, Herrerías JM, González FX, Galindo A. Expanded allogeneic adipose-derived stem cells (eASCs) for the treatment of complex perianal

fistula in Crohn's disease: results from a multicenter phase I/IIa clinical trial. *Int J Colorectal Dis.* 2013 Mar;28(3):313-23

De Miguel MP, Fuentes-Julián S, Blázquez-Martínez A, Pascual CY, Aller MA, Arias J, Arnalich-Montiel F. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med.* 2012 Jun;12(5):574-91

DelaRosa O., Sánchez-Correa B., Morgado S., Ramírez C., del Río B, Menta R, Lombardo E., Tarazona R., Delgado M. Human adipose-derived stem cells impair natural killer cell function and exhibit low susceptibility to natural killer-mediated lysis. *Stem Cells Dev.* 2012 May 20; 21(8): 1333-1343.

DelaRosa O, Lombardo E, Beraza A, et al. Requirement of IFN γ -mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A.* 2009;15:2795-2806.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8:315-317.

Doorn J, Moll G, Le Blanc K, et al. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells: paracrine effects and potential improvements. *Tissue Eng Part B Rev.* 2012 Apr;18(2):101-15

Dudkiewicz M, Malanowski P, Czerwin Ski J, Pawlowski K. An approach to predicting hematopoietic stem cell transplantation outcome using HLA-mismatch information mapped on protein structure data. *Biol Blood Marrow Transplant,* 15 (2009), p. 1014

Duquesnoy RJ. ASHI, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, Laboratory manual. 4a edición (2000) Lenexa, KS

Duquesnoy RJ. HLAMatchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. I. Description of the algorithm. *Hum Immunol.* 2002 May;63(5):339-52

Duquesnoy RJ. Clinical usefulness of HLAMatchmaker in HLA epitope matching for organ transplantation. *Curr Opin Immunol.* 2008 Oct;20(5):594-601

Dvash T, Ben-Yosef D, Eiges R. Human embryonic stem cells as a powerful tool for studying human embryogenesis. *Pediatr Res.* 2006 Aug;60(2):111-7

El-Awar N, Terasaki PI, Nguyen A, Sasaki N, Morales-Buenrostro LE, Saji H, Maruya E, Poli F. Epitopes of human leukocyte antigen class I antibodies found in sera in normal healthy males and cord blood. *Hum Immunol.* 2009 Oct;70(10):844-53

Eliopoulos N, Stagg J, Lejeune L, Pommey S, Galipeau J. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I-and class II-mismatched recipient mice. *Blood* 2005, 106: 4057–4065

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998;279:1528-1530

Friedenstein AJ, Latzinik NW, Grosheva AG, Gorskaya UF. Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges. *Exp Hematol*. 1982;10:217-227

Garavoy MR, Rheinschmidt MA, Bogos M. Flow cytometry analysis: a high technology crossmatch technique facilitating transplantation. *Transplant Proc* (1983) 15(3):1939–94.

García-Sancho J, Sánchez A, Vega A, Noriega DC, Nocito M. Influence of HLA Matching on the Efficacy of Allogeneic Mesenchymal Stromal Cell Therapies for Osteoarthritis and Degenerative Disc Disease. *Transplant Direct*. 2017 Aug 17;3(9):e205

Gebel HM, Bray RA, Nickerson O. Pre-transplant assessment of donor-reactive, HLA-specific antibodies in renal transplantation: contraindication vs risk, *Am J Transplant* 2003; 3:1488-1500.

Ghannam S, Pene J, Torcy-Moquet G, Jorgensen C, Yssel H. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *J Immunol* 2010 185: 302–312

Gibson T, Medawar PB. The fate of skin homografts in man. *J Anat*. 1943 Jul;77(Pt 4):299-310.4

Giuliani M, Fleury M, Vernochet A, Ketrroussi F, Clay D, et al. Long-lasting inhibitory effects of fetal liver mesenchymal stem cells on T-lymphocyte proliferation. *PLoS One* (2011) 6: e19988

Götherström C. Immunomodulation by multipotent mesenchymal stromal cells. *Transplantation*. 2007 Jul 15;84(1 Suppl):S35-7

Gourraud PA, Gilson L, Girard M, Peschanski M. The role of human leukocyte antigen matching in the development of multiethnic “haplobank” of induced pluripotent stem cell lines. *Stem Cells*, 30 (2012), p. 180

Griffin MD, Ryan AE, Alagesan S, Lohan P, Treacy O, Ritter T. Anti-donor immune responses elicited by allogeneic mesenchymal stem cells: what have we learned so far?. *Immunol Cell Biol*. 2013 Jan;91(1):40-51.

Halloran PF, Wadgyamar A, Ritchie S, et al. The significance of anti-class I antibody response. I. Clinical and pathologic features of anti-class I mediated rejection. *Transplantation* 1990; 49:85-91.

Halloran PF, Schlaut J, Solez K, et al The significance of anti-class I antibody response. II. Clinical and pathologic features of renal transplants with anti-class I-like antibody. *Transplantation* 1992; 53:550-555.

Halvorsen YC, Wilkison WO, Gimble JM Adipose-derived stromal cells—their utility and potential in bone formation. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000 Nov;24 Suppl 4:S41-4

Hansen TH, Bouvier M MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies. *Nature reviews Immunology*. 2009 Jul;9(7):503-13

Harshyne LA, Watkins SC, Gambotto A, Barratt-Boyes SM. Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *Journal of immunology*. 2001 Mar 15;166(6):3717-23.

Hendy P, Hart A. A review of Crohn's disease. *EMJ Gastroenterol*. 2013;1:116-123

Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, Salcido Ochoa F, James MJ, Marelli-Berg FM, et al A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells *Journal of immunology*. 2004 Oct 15;173(8):4828-37

Hocine HR, Costa HE, Dam N, Giustiniani J, Palacios I, Loiseau P, Bensussan A, Borlado LR, Charron D, Suberbielle C, Jabrane-Ferrat N, Al-Daccak R. Minimizing the risk of allo-sensitization to optimize the benefit of allogeneic cardiac-derived stem/progenitor cells. *Sci Rep*. 2017 Jan 24;7:41125

Hong SH, Gang EJ, Jeong JA, et al. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;330:1153-1161.

Hornick P. Direct and indirect allorecognition. *Methods in molecular biology*. 2006;333:145-56

Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx LC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cells therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jun 25;99(13):8932-7

in 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential.

Irvine EJ. Usual therapy improves perianal Crohn's disease as measured by a new disease activity index. *J Clin Gastroenterol.* 1995 Jan;20(1):27-32

Isakova IA, Dufour J, Lanclos C, Bruhn J, Phinney DG Cell dose dependent increases in circulating levels of immune effector cells in rhesus macaques following intra-cranial injection of allogeneic MSCs. *Expt Hematol* 2010,38: 957–967.

Jack GS, Almeida FG, Zhang R, Alfonso ZC, Zuk PA, Rodriguez LV Processed lipoaspirate cells for tissue engineering of the lower urinary tract:implications for the treatment of stress urinary incontinence and bladder reconstruction. *J Urol.* 2005 Nov;174(5):2041-5

Janeway, C. A. Jr.; Travers, P.; Walport, M The major histocompatibility complex and its functions (2001) *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* (5 edición). Nueva York: Garland Science LIBRO

Jia Y, Zhao Y, Wang L, Xiang Y, Chen S, Ming CS, Wang CY, Chen G. Rat adipose-derived stem cells express low level of a-Gal and are dependent on CD59 for protection from human xenoantibody and complement-mediated lysis. *Am J Transl Res.* 2016 May 15;8(5):2059-69.

Joshua M. Hare, Joel E. Fishman, Gary Gerstenblith, Darcy L. DiFede Velazquez, Juan P. Zambrano et al. Comparison of Allogeneic vs Autologous Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells Delivered by Transendocardial Injection in Patients With Ischemic Cardiomyopathy: The POSEIDON Randomized Trial *JAMA.* 2012 Dec 12; 308(22): 2369–2379.

Karantalis V, Hernandez-Schulman I, Balkan W, Hare J.M. Allogeneic Cell Therapy. A New Paradigm in Therapeutics. *Circ Res.* 2015;116:12-15.

Kerr CL, Shablott MJ, Gearhart JD Pluripotent stem cells from germ cells. *Methods Enzymol.* 2006;419:400-26.

Khubutiya, MS., Vagabov, A. V., Temnov, A. A., and Sklifas, A. N. Paracrine mechanisms of proliferative, anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of mesenchymal stromal cells in models of acute organ injury. *Cytotherapy.* 2014 May;16(5):579-85.

Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, Dietrich M, Watson K, Klopp A, Battula VL, Weil M, Andreeff M, Marini FC. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells.* 2009 Oct;27(10):2614-23.

Kim JO, Choi SE, Lim BJ, Kim YS, Huh KH, Lee J, Kim SI, Kim MS, Jeong HJ. Clinical Significance of Macrophage Polarization in Antibody-Mediated Rejection of Renal Allograft. *Transplant Proc.* 2018 May;50(4):1005-1008

Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M., Shou, M., Lee, C., Barr, S., et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation.* 2004 Mar 30;109(12):1543-9

Klyushnenkova E, Mosca JD, McIntosh KR, Thiede MA Human mesenchymal stem cells suppress allogeneic T cell responses in vitro: implications for allogeneic transplantation. *Blood.* 1998; 92:2652

Kobie JJ, Zheng B, Bryk P, Barnes M, Ritchlin CT, Tabechian DA, Anandarajah AP, Looney RJ, Thiele RG, Anolik JH, Coca A, Wei C, Rosenberg AF, Feng C, Treanor JJ, Lee FE, Sanz I. Decreased influenza-specific B cell responses in rheumatoid arthritis patients treated with anti-tumor necrosis factor . *Arthritis Res Ther.* 2011;13(6):R209

Koc ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W Allogeneic mesenchymal stem cells infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy and Hurler syndrome. *Bone Marrow Transplant.* 2002 Aug;30(4):215-22

Krasinskas AM, Eiref SD, McLean AD, Kreisel D, Gelman AE, Popma SH, Moore JS, Rosengard BR. Replacement of graft-resident donor-type antigen presenting cells alters the tempo and pathogenesis of murine cardiac allograft rejection Transplantation. 2000 Aug 15;70(3):514-21

Lakkis FG, Lechler RI Origin and biology of the allogeneic response Cold Spring Harb Perspect Med. 2013 Aug 1;3(8).

Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated an undifferentiated Mesenchymal stem cells *ExpHematol.* 2003; 31:890-896.

Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, Ringdén O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.* 2004; 363:1439–1441

Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W, Ringdén O. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet.* 2008 May 10; 371(9624):1579-86.

Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, Semprun-Prieto L, Delafontaine P, Prockop DJ Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells

embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell*. 2009; 5:54–63.

Lentine KL, Graff RJ, Xiao H, Modanlou KA, Salvalaggio PR, Brennan DC, Pinsky BW, Burroughs TE, Schnitzler MA. Flow cytometry crossmatch before kidney transplantation in contemporary practice: target cell utilization, results patterns, and associated long-term graft survival. *ClinTranspl*. 2008:253-66.

Li, C., Li, G., Liu, M., Zhou, T., and Zhou, H. Paracrine effect of inflammatory cytokine-activated bone marrow mesenchymal stem cells and its role in osteoblast function *J Biosci Bioeng*. 2016 Feb;121(2):213-9.

Lobashevsky AL, Higgins NG, Rosner KM, Mujtaba MA, Goggins WC, Taber TE. Analysis of anti-HLA antibodies in sensitized kidney transplant candidates subjected to desensitization with intravenous immunoglobulin and rituximab *Transplantation*. 2013 Jul 27;96(2):182-90

López-Vázquez A, Mozo L, Alonso-Arias R, Suárez-Álvarez B, Vidal-Castiñeira JR, Arranz E, Volta U, Bousoño C, López-Hoyos M, Rodrigo L, López-Larrea C. Autoantibodies against MHC class I polypeptide-related sequence A are associated with increased risk of concomitant autoimmune diseases in celiac patients. *BMC Med*. 2014 Feb 25;12:3

Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, Duong van Huyen JP, Mooney N et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med* 2013, 369, 1215-1226.

Loveland BE, McKenzie IF. Cells mediating graft rejection in the mouse. III. Ly-1+ precursor T cells generate skin graft rejection. *Transplantation*. 1982 Apr;33(4):407-10.

Lucas D, Campillo JA, Lopez-Hernandez R, Martinez-Garcia P, Lopez-Sanchez M, Botella C, et al Allelic diversity of MICA gene and MICA/HLA-B haplotypic variation in a population of the Murcia region in southeastern Spain *Human immunology*. 2008 Oct;69(10):655-60

Maccario R, Podesta M, Moretta A, et al Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*. 2005;90:516–525.

Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*. 2003;10:228-241.

Mancheño-Corvo P, Menta R, del Río B, Franquesa M, Ramírez C, Hoogduijn MJ, DelaRosa O, Dalemans W, Lombardo E. T Lymphocyte Prestimulation Impairs in a Time-Dependent Manner the Capacity of Adipose Mesenchymal Stem Cells to Inhibit Proliferation: Role of Interferon γ , Poly I:C, and Tryptophan Metabolism in Restoring Adipose Mesenchymal Stem Cell Inhibitory Effect. *Stem Cells Dev.* 2015 Sep 15;24(18):2158-70

Meisel R, Zibert A, Laryea M, et al. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood.* 2004;103:4619-4621.

Miao Z, Jin J, Chen L, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int.* 2006;30:681-687.

Moll G, Jitschin R, von Bahr L, Rasmusson-Duprez I, Sundberg B, Lönnies L, Elgue G, Nilsson-Ekdahl K, Mougiakakos D, Lambris JD, Ringdén O, Le Blanc K, Nilsson B. Mesenchymal stromal cells engage complement and complement receptor bearing innate effector cells to modulate immune responses. *PLoS One.* 2011;6(7):e21703.

Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vázquez LA, Lee JH, El-Awar N, Alberú J. "Natural" human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. *Transplantation.* 2008 Oct 27;86(8):1111-5

Moreno C, Burgos L, Perez-Robles C, Delgado JA, Mata JJ, Errasti P, Martin P, Merino J, Sanchez-Ibarrola A. Predictive value of the Luminex single antigen panel for detecting flow cytometry cross-match positivity. *Human Immunology.* 2012 May;73(5):517-21.

Moscoso J, Serrano-Vela JJ, Arnaiz-Villena A. MHC-F polymorphism and evolution. *Tissue Antigens.* 2007 Apr;69 Suppl 1:136-9

Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends Immunol.* 2013;34:137-143.

Muro M, Llorente S, Gonzales-Soriano MJ, Minguela A, Gimeno L, Alvarez-Lopez MR. Pre-formed Donor-specific Alloantibodies (DSA) Detected Only by Luminex Technology Using HLA-Coated Microspheres and Causing Acute Humoral Rejection and Kidney Graft Dysfunction. *Clin Transpl.* 2006:379-83

Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am.* 2004; 86-A:1541-1558

Najar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H, et al. Immune-related antigens, surface molecules and regulatory factors in human-derived mesenchymal stromal cells: the expression and

impact of inflammatory priming. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2012;8(4):1188-1198.

Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007 Nov 15;110(10):3499-506

Newell KA, Asare A, Kirk AD, Gisler TD, Bourcier K, Suthanthiran M, Burlingham WJ, Marks WH, Sanz I, Lechler RI, Hernandez-Fuentes MP, Turka LA, Seyfert-Margolis VL; Immune Tolerance Network ST507 Study Group. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest*. 2010 Jun;120(6):1836-47

Nickel P, Presber F, Bold G, Biti D, Schönemann C, Tullius SG, Volk HD, Reinke P. Enzyme-linked immunosorbent spot assay for donor-reactive interferon-gamma-producing cells identifies T-cell presensitization and correlates with graft function at 6 and 12 months in renal-transplant recipients *Transplantation*. 2004 Dec 15;78(11):1640-6

Nikaein A, El-Awar N, Hunt J, Rosenthal EJ, Eichhorn E, Hall S, Boehrer J, Magee M, Pieniek M, Brinkman W, Dewey T. Clinically irrelevant circulating human leukocyte antigen antibodies in the presence of ventricular assist devices. *J Heart Lung Transplant*. 2012 May;31(5):443-7

Panés J, García-Olmo D, Van Assche G, Colombel JF, Reinisch W, Baumgart DC, Dignass A, Nachury M, Ferrante M, Kazemi-Shirazi L, Grimaud JC, de la Portilla F, Goldin E, Richard MP. Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Cx601) for complex perianal fistulas in Crohn's disease: a phase 3 randomised, double-blind controlled trial. *Lancet*. 2016 Sep 24;388(10051):1281-90

Panés J, García-Olmo D, Van Assche G, Colombel JF, Reinisch W, Baumgart DC, Dignass A, Nachury M, Ferrante M, Kazemi-Shirazi L, Grimaud JC, de la Portilla F, Goldin E, Richard MP, Diez MC, Tagarro I, Leselbaum A, Danese S; ADMIRE CD Study Group Collaborators. Long-term Efficacy and Safety of Stem Cell Therapy (Cx601) for Complex Perianal Fistulas in Patients With Crohn's Disease *Gastroenterology*. 2018 Apr;154(5):1334-1342.e4.

Panigrahi A, Gupta N, Siddiqui JA, Margoob A, Bhowmik D, Guleria S, Mehra NK. Post transplant development of MICA and anti-HLA antibodies is associated with acute rejection episodes and renal allograft loss *Hum Immunol*. 2007 May;68(5):362-7

Peyrin-Biroulet L, Deltenre P, de Suray N, Branche J, Sandborn WJ, Colombel JF. Efficacy and safety of tumor necrosis factor antagonists in Crohn's disease: meta-analysis of placebo-controlled trials. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008 Jun;6(6):644-53

Phinney DG, Prockop DJ Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair - current views Stem Cells (2007) 25: 2896–2902.

Pietra BA, Wiseman A, Bolwerk A, Rizeq M, Gill RG CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II The Journal of clinical investigation. 2000 Oct;106(8):1003-10

Pikul FJ, Bolman RM, Saffitz JE, Chaplin H. Anti-B-mediated rejection of an ABO-incompatible cardiac allograft despite aggressive plasma exchange transfusion Transplant Proc. 1987 Dec;19(6):4601-4

Poncelet AJ, Vercruyse J, Saliez A, Gianello P Although pig allogeneic mesenchymal stem cells are not immunogenic in vitro, intra-cardiac injection elicits an immune response in vivo. Transplantation 2007. 83: 783–790

Puissant B, Barreau C, Bourin P, et al Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. Br J Haematol. 2005 Apr;129(1):118-29

Purandare B, Teklemariam T, Zhao L, Hantash BM. Temporal HLA profiling and immunomodulatory effects of human adult bone marrow-and adipose-derived Mesenchymal stem cells. Regenerative medicine. 2004Jan;9(1):67-79. Regen Med. 2014 Jan;9(1):67-79

Rangappa S, Fen C, Lee EH, Bongso A, Sim EK Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes Ann Thorac Surg. 2003;75:775-779.

Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. Stem Cell (2008) 2: 141–150

Ren ML, Peng W, Yang ZL, Sun XJ, Zhang SC, Wang ZG, Zhang B Allogeneic adipose-derived stem cells with low immunogenicity constructing tissue-engineered bone for repairing bone defects in pigs. Cell Transplant. 2012;21(12):2711-21

Resch T, Fabritius C, Ebner S, Ritschl P, Kotsch K. The Role of Natural Killer Cells in Humoral Rejection Transplantation 2015. 99, 1335-1340.

Roemeling-van Rhijn M, Reinders ME, Franquesa M, Engela AU, Korevaar SS, Roelofs H, Genever PG, Ijzermans JN, Betjes MG, Baan CC, Weimar W, Hoogduijn MJ. Human Allogeneic Bone Marrow and Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stromal Cells Induce CD8+ Cytotoxic T Cell Reactivity. J Stem Cell Res Ther. 2013 Dec 12;3(Suppl 6):004

Rogers NJ, Lechler RI. Allorecognition. Am J Transplant. 2001 Jul;1(2):97-102

Russo V, Zhou D, Sartirana C, Rovere P, Villa A, Rossini S, et al. Acquisition of intact allogeneic human leukocyte antigen molecules by human dendritic cells. *Blood*. 2000 Jun 1;95(11):3473-7

Salinas GF, De Rycke L., Barendregt B., Paramarta JE, Hreggvidsdottir H, Cantaert T, van der Burg M, Tak PP, Baeten D. Anti-TNF treatment blocks the induction of T cell-dependent humoral responses. *Ann Rheum Dis*. 2013 Jun;72(6):1037-43

Santos GW. History of bone marrow transplantation. *Clin Haem* 1983;12:611-39

Schäffler A, Büchler C. Concise Review: Adipose Tissue-derived Stromal Cells-Basic Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies. *Stem Cells*. 2007 Apr;25(4):818-27.

Schu S, Nosov M, O'Flynn L, Shaw G, Treacy O, Barry F, Murphy M, O'Brien T, Ritter T. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med*. 2012 Sep;16(9): 2094-2103

Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells* (2008)26: 212–222

Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2011;6:457-478.

Skyler JS, Fonseca VA, Segal KR, Rosenstock J. Allogeneic Mesenchymal Precursor Cells in Type 2 Diabetes: A Randomized, Placebo-Controlled, Dose-Escalation Safety and Tolerability Pilot Study *Diabetes Care*. 2015 Sep; 38(9): 1742–1749

Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, et al. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2 *Blood* 2008. 111: 1327–1333

Spies T. Regulation of NKG2D ligands: a purposeful but delicate affair. *Nature immunology*. 2008 Sep;9(9):1013-5.

Stagg J, Pommey S, Eliopoulos N, Galipeau J. Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood*. 2006; 107:2570–2577.

Sudres M, Norol F, Trenado A, Gregoire S, Charlotte F, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *J Immunol* 2006. 176: 7761–7767.

Tait BD, Süsal C, Gebel HM, Nickerson PW, Zachary AA, Claas FH, Reed EF et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation*. 2013 Jan 15;95(1):19-47

Terasaki PI. Antibody response to homograft. I. Preliminary studies of the time of appearance of lymphoagglutinins upon homografting. *Am Surg* 1959;11:896-9

Terasaki PI, Mickey MR, Kreisler M. Presensitization and kidney transplant failure. *Postgrad Med J*. 1971 Feb;47(544):89-100

Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant*. 2003 Jun;3(6):665-73.

Tolar J, Le Blanc K, Keating A, Blazar BR Concise review: hitting the right spot with mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* (2010)28: 1446–1455.

Toma C, Wagner WR, Bowry S, Schwartz A, Villanueva F. Fate of culture-expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature: in vivo observations of cell kinetics. *Circ Res*. 2009; 104:398–402

Torres J, Mehandru S, Colombel JF, Peyrin-Biroulet L. Crohn's disease *Lancet*. 2017 Apr 29;389(10080):1741-1755.

Vaes B, Van't Hof W, Deans R, Pinxteren J Application of MultiStem(®) allogeneic cells for immunomodulatory therapy: clinical progress and pre-clinical challenges in prophylaxis for graft versus host disease. *Front Immunol*. 2012;3:345

Van Assche G, Dignass A, Panes J, Beaugerie L, Karagiannis J, Allez M, Ochsenkühn T, Orchard T, Rogler G, Louis E, Kupcinkas L, Mantzaris G, Travis S, Stange E; European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis*. 2010 Feb;4(1):7-27

Verfaillie CM. Adults stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol*. 2002 Nov;12(11):502-8

von Bahr L, Batsis I, Moll G, Hägg M, Szakos A, Sundberg B, Uzunel M, Ringden O, Le Blanc K. Analysis of tissues following mesenchymal stromal cell therapy in humans indicates limited long-term engraftment and no ectopic tissue formation. *Stem Cells*. 2012 Jul;30(7):1575-8

Walter M., Kohli, N., Major, T., Fuller, H., Wright, K., Kuiper, J., et al. Human mesenchymal stem cells stimulate EaHy926 endothelial cell migration: combined proteomic and in vitro analysis of the influence of donor-donor variability. *J Stem Cells Regen Med*. 2015 May 30;11(1):18-24

Wang Y, Shimmin A, Ghosh P, Marks P, Linklater J, Connell D, Hall S, Skerrett D, Itescu S, Cicuttin FM. Safety, tolerability, clinical, and joint structural outcomes of a single intra-articular injection of allogeneic mesenchymal precursor cells in patients following anterior cruciate ligament reconstruction: a controlled double-blind randomised trial. *Arthritis Res Ther.* 2017; 19: 180.

Williams RC, Opelz G, Weil EJ, McGarvey CJ, Chakkera HA. The Risk of Transplant Failure With HLA Mismatch in First Adult Kidney Allografts 2: Living Donors, Summary, Guide Transplant Direct. 2017 Apr 7;3(5):e152.

Wong KL, Tai JJ, Wong WC, Han H, Sem X, Yeap WH, Kourilsky P, Wong SC. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 118 (2011)e16-31

Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res.* 2000;61:364-370

Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, Sato K, Inoue K, Nagase T, Koshima I, Gonda K. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol.* 2006 Jul;208(1):64-76

Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res.* 1998;16:406-413.

Zangi L, Margalit R, Reich-Zeliger S, Bachar-Lustig E, Beilhack A, Negrin R, Reisner Y. Direct imaging of immune rejection and memory induction by allogeneic mesenchymal stromal cells. *Stem Cells.* 2009; 27:2865–2874

Zhang Q, Reed EF. Non-MHC antigenic targets of the humoral immune response in transplantation. *Curr Opin Immunol.* 2010 Oct;22(5):682-8

Zou Y, Stastny P, Süsal C, Döhler B, Opelz G. Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *N Engl J Med.* 2007 Sep 27;357(13):1293-300.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7:211-228

ANEXOS

PUBLICACIONES DURANTE LA TESIS

Dado el carácter confidencial de los resultados gran parte del trabajo realizado se haya publicado en la documentación interna de TiGenix.

Toda esta documentación ha sido utilizada como complemento al dossier enviado a la Agencia Europea del Medicamento para dar soporte al "Electronic Common Technical Document: eCTD", dicha información es de carácter confidencial.

No obstante, los resultados preliminares que asentaron la base a esta tesis han sido publicados en:

- Álvaro-Gracia JM, Jover JA, García-Vicuña R, Carreño L, Alonso A, Marsal S, Blanco F, Martínez-Taboada VM, Taylor P, **Martín-Martín C**, DelaRosa O, Tagarro I, Díaz-González **Intravenous administration of expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells in refractory rheumatoid arthritis (Cx611): results of a multicentre, dose escalation, randomised, single-blind, placebo-controlled phase Ib/IIa clinical trial.** F. Ann Rheum Dis 2016;0:1–7. doi:10.1136/annrheumdis-2015-208918).

Otros trabajos publicados durante el desarrollo de la tesis:

- **C. Martín-Martín¹**, C. Ramirez², B. del Río², P. Mancheño-Corvo², E. Lombardo², J.L. Castañer¹, W. Dalemans³ and O.DelaRosa². **Understanding allo-sensitization after local administration of allogeneic adipose derived stem cells (eASC)** 1.Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain, 2.R&D department.Tigenix S.A.U, Madrid, Spain, 3.R&D department.Tigenix NV, Lovaina, Belgium. XXV European Society of Gene and Cell Therapy Congress. Berlín. Septiembre 2017.Póster
- **C. Martín Martín¹**, C. Ramirez², M. Moreno¹, E. Lombardo², W. Dalemans³, J. Castañer¹, O. DelaRosa². **Low risk of allo-sensitization after intravenous administration of allogeneic adipose derived stem cells in refractory rheumatoid arthritis patients.** ¹Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain, ²R&D department.Tigenix S.A.U, Madrid, Spain, ³R&D department.Tigenix NV, Lovaina, Belgium. 4th European Congress of Immunology, Viena.Septiembre 2015.Póster
- **C. Martín Martín**, M. Moreno, I. Gañán, J. Castañer. **LabscreenMix™ assay allows us to discriminate between a memory response and development *de novo* anti-HLA antibodies.**;Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain. 4th European Congress of Immunology, Viena.Septiembre 2015.Póster

APROBACIÓN DE CX601 POR LA AGENCIA EUROPEA DEL MEDICAMENTO

Los resultados del presente trabajo, han sido presentados junto con el resto de documentación perteneciente al ensayo clínico en fase III de CX601, contribuyendo a su aprobación y distribución para su uso en pacientes con Enfermedad de Crohn fistulizante. El código de producto en la agencia es EMEA/H/C/004258, su nombre de comercialización es Alofisel (principio activo, Darvadstrocel).

La Comisión Europea concedió una autorización de comercialización válida en toda la Unión Europea para Alofisel el 23 de marzo de 2018. El EPAR (European public assessment report) completo para Alofisel se puede encontrar en el sitio web de la Agencia:

[ema.europa.eu/Find medicine/Human medicines/European public assessment reports](http://ema.europa.eu/Find%20medicine/Human%20medicines/European%20public%20assessment%20reports)

El resumen del dictamen del Comité de Medicamentos Huérfanos para Alofisel puede ser encontrado en:

[ema.europa.eu/Encontrar medicamentos / Medicamentos humanos / Designación de enfermedades raras](http://ema.europa.eu/Encontrar%20medicamentos%20/%20Medicamentos%20humanos%20/%20Designación%20de%20enfermedades%20raras)

De igual forma, se ha iniciado un nuevo ensayo clínico en fase III, pero a nivel global (EU, US, CA, IR) y se pretende seguir el protocolo de monitorización y cruce de datos propuesto en este trabajo, que permitirá esclarecer aquellas cuestiones que por falta de representación no han sido resueltas.