

**XV CONGRESO DE HEMATOLOGÍA  
V CONGRESO DE MEDICINA TRANSFUSIONAL**

**LINFOCITOS T HUMANOS ACTIVADOS EX-VIVO Y TRANSDUCIDOS CON EL GEN SUICIDA CD34-TK  
GENERAN GVHD (ENFERMEDAD DE INJERTO VERSUS HUÉSPED) Y SON EFICIENTEMENTE  
ELIMINADOS *IN VIVO* EN UN MODELO DE RATÓN.**

**Nervi B<sup>1</sup>, Rettig MP<sup>2</sup>, Ritchey JK<sup>2</sup>, Bauer G<sup>2</sup>, Walker J<sup>2</sup> y DiPersio JF<sup>1</sup>.**

Universidad Católica de Chile<sup>1</sup>, Washington University School of Medicine, Saint Louis, MO, USA<sup>2</sup>

Relator : Bruno Nervi Nattero  
E-mail : [bnervi@med.puc.cl](mailto:bnervi@med.puc.cl)

**RESUMEN**

**INTRODUCCIÓN:** No existen buenos modelos para evaluar *in vivo* el impacto de la manipulación *ex vivo* de linfocitos humanos T (huT). Los ratones inmunosuprimidos NOD/SCID $\beta$ 2M<sup>null</sup> ( $\beta$ 2) no tienen actividad de macrófagos, linfocitos B, T o Natural Killer. En este trabajo demostramos que estos ratones no solo toleran la expansión *in vivo* de linfocitos T humanos, sino también recapitulan todas las fases del GVHD observadas en el trasplante hematopoyético alogénico humano.

**MÉTODOS:** Ratones  $\beta$ 2 fueron condicionados con 250cGy irradiación corporal total (ICT) e inyectados con  $10^7$  huT por la vena de la cola (ev) o por vía retroorbital (ro). Seguimos la aparición de signos de GVHD, cambios en el peso, la expansión de huT y la infiltración en órganos blanco (pulmón, hígado, intestino, piel). Para estudiar el tráfico y expansión de huT modificamos genéticamente huT insertando un gen de luciferasa (clic beetle red; huT<sup>CB $\beta$ luc/EGFP</sup>) permitiendo seguir la expansión *in vivo* de huT con bioluminiscencia (BLI). También insertamos un gen suicida en huT consistente en el CD34 humano y la timidita kinasa herpética (HSV-tk). La proteína de fusión  $\beta$ CD34-TK confiere sensibilidad al ganciclovir permitiendo la eliminación *in vivo* de los huT.

**RESULTADOS:** Inicialmente estudiamos diferencias en la ruta de administración de huT comparando la inyección en la vena de la cola (ev) versus retroorbital (ro). Ratones  $\beta$ 2 recibieron 250 cGy ICT y luego  $10^7$  huT por ruta ev (n=28) versus ro (n=32). Los ratones inyectados ev tuvieron <10% huT en sangre y ninguno desarrolló signos de GVHD. Los inyectados ro tuvieron 1) > 20% huT en sangre (p<0.005) y 60% desarrolló GVHD letal caracterizado por pérdida de >20% del peso corporal (p<0.02); 2) mayor activación de huT con significativo aumento en CD25, CD30 y CD69; 3) aumento en producción de IFN $\gamma$  sérico; 4) infiltración de huT en bazo (46%), hígado (60%) y pulmón (50%); y 5) demostración patológica de GVHD. Diez ratones  $\beta$ 2 recibieron 250cGy ICT y luego  $10^7$  huT<sup>CB $\beta$ T/EGFP</sup> por vía ev (n=5) o ro (n=5). Los ratones inyectados ev no desarrollaron GVHD, mientras que el 60% de los ratones inyectados ro desarrolló GVHD letal. El seguimiento seriado con BLI demostró que en los ratones inyectados ev se produce una rápida migración de huT a los pulmones, donde son eliminados, seguido por una falla en la expansión en las siguientes 3 semanas. Por el contrario, los ratones inyectados ro presentaron expansión de la señal de BLI en el espacio retroorbital, seguido migración a órganos linfáticos, seguido por infiltración en órganos blancos como hígado, intestino y piel hasta la muerte de los ratones por GVHD. Diez ratones  $\beta$ 2 recibieron 250cGy ICT y luego  $10^7$  huT $\beta$ CD34-TK. La mitad recibió tratamiento con Ganciclovir (GCV; 5 mg/kg/día por 7 días), comenzando al día siguiente de la inyección de huT. GCV eliminó eficientemente los huT $\beta$ CD34-TK previniendo el desarrollo de GVHD.

**CONCLUSIONES:** Desarrollamos un modelo xenogénico de GVHD producido por linfocitos T humanos en ratones. Los huT inyectados ro expanden *in vivo*, se aloactivan, e infiltran órganos blanco produciendo daño tisular característico del GVHD. La transducción de huT con el gen suicida  $\beta$ CD34-TK permiten su eliminación *in vivo* previniendo el desarrollo de GVHD. Esta estrategia permitiría obtener los beneficios de la infusión de huT en trasplantes hematopoyéticos humanos, con la posibilidad de eliminar los huT si se desarrolla GVHD que no responda a los tratamientos convencionales.