

EMILIA VILLAMIL PEDETTI
TESINA DE GRADO
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA HUMANA

CARACTERIZACIÓN DEL INMUNORECEPTOR CD300F EN UN MODELO DE DOLOR CRÓNICO

ORIENTADORA: PHD. NATALIA LAGO
TUTOR DE CARRERA: DR. HUGO PELUFFO
LABORATORIO DE NEUROINFLAMACIÓN Y TERAPIA GÉNICA
INSTITUT PASTEUR DE MONTEVIDEO

AGOSTO 2014

CONTENIDO

RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
Dolor y dolor crónico	7
¿Cómo se estudia el dolor crónico?	10
Rol de células no neuronales en el dolor	11
Células del sistema inmune innato	11
Células del sistema nervioso	11
Mastocitos	12
Macrófagos	12
Efecto de las citoquinas y quimioquinas en el dolor	12
Inmunoreceptores	13
Familia de inmunoreceptores CD300	13
CD300f	14
Aproximaciones terapéuticas para el dolor crónico	14
Terapia génica	14
Vectores virales	14
Lentivirus y VIH-I	15
Organización del genoma de HIV-I y función de las proteínas de origen viral	15
Aplicación de los lentivirus en terapia génica	16
Bioseguridad y uso de LVs derivados de HIV-I	17
OBJETIVOS	20
Objetivos Generales	20
Objetivos específicos	20
Descripción del modelo de dolor crónico y expresión de CD300f en el mismo	20
Evaluación del efecto de la modulación del inmunoreceptor sobre la nocicepción	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Animales y modelo de dolor crónico inflamatorio	21
Algesimetría térmica	21
Procesamiento de muestras	21
Tinción con Azul de Toluidina	22
Inmunofluorescencia	22
Autofluorescencia en piel	23
Inyección de una proteína de fusión	23
Producción de lentivirus integrativos	23
Producción y purificación a gran escala de plásmido libre de endotoxinas para la producción de vectores lentivirales	23
Producción de LVs de tercera generación	23
Purificación de LVs	24
Titulación de LVs	24
Inyección de LVs IREM1 y GFP	24
Análisis estadístico	24

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
Descripción del modelo de dolor crónico inflamatorio	25
Población celular del modelo	25
Algesimetría térmica	27
Evaluación de la expresión de CD300f en inflamación	27
Efecto de la modulación del inmunoreceptor CD300f en un modelo de dolor crónico inflamatorio	29
Bloqueo de la interacción CD300f-ligando	29
Sobreexpresión de CD300f	30
Producción de LVs	30
Puesta a punto inmunofluorescencia con el anticuerpo UPD2	30
Titulación de los LVs	32
Transducción in vivo	33
Inyección de LVs en modelo de dolor inflamatorio	34
Verificación de la transducción mediante inmunohistoquímica	36
CONCLUSIÓN GENERAL	39
PERSPECTIVAS	39
BIBLIOGRAFÍA	41

RESUMEN

Según la International Association for the Study of Pain (IASP) el dolor se define como una experiencia desagradable consecuencia de un daño tisular potencial o real. El dolor agudo generalmente dura mientras el estímulo doloroso se encuentre presente y luego se resuelve rápidamente, funcionando como un mecanismo de defensa y protección de los individuos ante cualquier daño. Por lo contrario, el dolor crónico perdura en el tiempo, aún sin el estímulo presente¹. Dos consecuencias evidentes del dolor crónico son la disminución en la calidad de vida de quienes lo padecen y el alto costo sanitario que genera esta afección.

La percepción del dolor es una experiencia subjetiva caracterizada no solo por determinantes sensoriales sino por factores que modulan el procesamiento cognitivo y emocional tales como la experiencia anterior, los estados afectivos, la edad y el género. Por otro lado, los mecanismos moleculares del dolor a nivel central y periférico han sido estudiados profundamente y, aunque se ha ganado mucho conocimiento, la aplicación del mismo a la creación de tratamientos ha sido poco fructífera. La principal causa de esto se le ha atribuido a la gran cantidad de mediadores y vías de señalización celulares que contribuyen al dolor crónico y a la redundancia funcional entre ellas. Estos factores hacen difícil definirlo y tratarlo.

Últimamente se ha reconocido que una variedad de células del sistema inmune pueden jugar un papel importante en la iniciación y modulación de los efectos dolorosos, ya que al ser activadas por señales inflamatorias pueden desencadenar la liberación de mediadores que actúen directamente sobre los nociceptores o indirectamente provocando la liberación de otros mediadores. Uno de los efectos de estos mediadores es la sensibilización de los nociceptores que tiene como consecuencia la disminución del umbral de activación de los mismos. Esto genera un constante tráfico de señales aferentes que contribuye de forma importante a la sensibilización del Sistema Nervioso Central (SNC). Junto con una resolución incorrecta de la inflamación esto puede provocar dolor crónico. Modular las células del sistema inmune y su producción de mediadores puede ser una estrategia prometedora en el tratamiento del dolor crónico. La activación o inhibición de muchas de las células del sistema inmunitario depende de un balance entre señales positivas y negativas captadas por receptores, generalmente de membrana. El receptor CD300f se expresa en la línea mieloide y puede ser tanto un activador como un inhibidor celular. Se ha contextualizado a esta molécula en varios estudios mostrando su efecto modulador en distintos tipos de inflamación. Los ratones knockout para este receptor muestran un desarrollo normal de los mastocitos, aunque la ausencia del receptor exagera las respuestas alérgicas, aumentando la anafilaxis, la inflamación de las vías respiratorias y la dermatitis atópica². A su vez se ha identificado al receptor como un regulador anti-inflamatorio de las células efectoras mieloides en la desmielinización autoinmune³. Resultados de nuestro laboratorio muestran que la sobreexpresión del CD300f tiene un efecto neuroprotector después de un daño cerebral excitotóxico agudo en rata⁴. Por lo tanto, el efecto modulador de este receptor, le asigna un posible rol en desórdenes inflamatorios (incluyendo el dolor crónico) y los ha llevado a ser considerados como posibles blancos terapéuticos.

El objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar al inmunoreceptor CD300f en el contexto de dolor inflamatorio. Nuestra hipótesis es que la modulación del inmunoreceptor producirá cambios en la sensibilidad nociceptiva. Para ello, hemos utilizado un modelo murino de dolor inflamatorio generado por una inyección intraplantar de Adyuvante Completo de Freund (ACF). Para caracterizar el modelo se estudió la población de mastocitos a las 6, 24 y 48 horas postinyección de ACF y se evaluó la algometría térmica mediante el test de Hargreaves desde el día 1 hasta el 14 postinyección de ACF⁵. El dolor se pudo observar desde las 24 horas y se mantuvo hasta el día 14, con una mejoría paulatina a medida que transcurrió el tiempo. En cuanto a la población mastocitaria, se utilizó la tinción de Nissl para identificarla y mediante un conteo se observó un incremento de aproximadamente un 60% a las 24 horas de producida la inflamación. Estos resultados se correlacionan con el incremento en la expresión de CD300f observado mediante inmunohistoquímica.

Para evaluar la modulación del inmunoreceptor se trabajó con una proteína de fusión que bloquea el ligando del CD300f. Los resultados muestran que una sola inyección de la proteína de fusión no es suficiente para exacerbar la hiperalgesia térmica. La utilización de ratones CD300f-KO serán necesarios para confirmar este resultado. Entre las técnicas utilizadas para el tratamiento del dolor crónico se destaca la terapia génica, utilizada para mediar moléculas celulares, desde ARN no

codificante hasta proteínas⁶. Su eficacia ha sido mostrada en diversos ensayos preclínicos y un ensayo clínico en humanos (fase I), observándose una tolerancia en los pacientes tratados y una respuesta dosis dependiente adecuada⁷. Los vectores lentivirales (LVs), derivados del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) generan interés en terapia génica debido a su habilidad de infectar células postmitóticas y de integrar ADN foráneo al genoma celular. Esta fue la última técnica utilizada para evaluar la modulación de CD300f. Se produjeron LVs que portaban el transgén de CD300f humano y se inyectaron intraplantarmente, 3 horas después de inyectar el ACF en los ratones. Los resultados muestran una disminución estadísticamente significativa del dolor en los animales con el tratamiento. Además no se observó diferencias entre el grupo que se trató con un lentivector control portador del transgén GFP y el grupo control inyectado con PBS. Por último se pudo verificar la transducción de células in vivo luego del sacrificio de los ratones a los 14 días mediante inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo anti CD300f humano y un anticuerpo anti GFP.

En conclusión, se ha caracterizado la población celular mastocitaria en un modelo de dolor crónico así como la expresión del inmunoreceptor CD300f en el mismo. Se ha logrado producir por primera vez un lentivector portador del transgén CD300f humano y se ha comprobado su transducción in vitro e in vivo. Posteriormente se ha utilizado al mismo para la sobreexpresión del inmunoreceptor; la evidente disminución del dolor en los animales con el tratamiento propone al CD300f como una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento del dolor crónico.

INTRODUCCIÓN

Dolor y dolor crónico

El dolor se define como una experiencia desagradable consecuencia de un daño tisular potencial o real. Se han descripto tres tipos de dolor, clasificándolos según las condiciones que lo inician: dolor agudo, dolor por injuria en tejido (dolor inflamatorio) y dolor por injuria en nervio (dolor neuropático)¹. El dolor agudo se manifiesta como una respuesta normal hacia un estímulo nocivo resolviéndose al remover el mismo, lo que evidencia una función protectora en los organismos. Sin embargo el dolor crónico perdura en el tiempo aun cuando el estímulo no se encuentra presente.

La percepción del dolor está mediada por receptores cuya función es traducir una señal nociceptiva en una señal eléctrica que pueda ser interpretada por el SNC. Los receptores del dolor o nociceptores son terminaciones periféricas de las fibras aferentes sensoriales primarias⁸. Cuando un estímulo es aplicado a un receptor y alcanza el umbral de activación del mismo, se genera un potencial de acción por la apertura de canales dependientes de voltaje. El mismo puede ser llevado por una distancia considerable hasta neuronas del SNC, pasando por ganglios de la raíz dorsal, luego por el asta posterior medular y por vías ascendentes hacia los núcleos supraespinales y espinales hasta llegar a áreas corticales asociadas al dolor⁹.

No todos los estímulos dolorosos nos afectan de la misma forma y esto se debe a varios factores. La percepción del dolor es una experiencia subjetiva caracterizada no solo por determinantes sensoriales sino por factores que modulan el procesamiento cognitivo y emocional tales como la experiencia anterior, los estados afectivos, la edad y el género. En cuanto a los procesos moleculares, existen infinidad de factores que afectan cada paso de la transmisión del estímulo desde la periferia hasta el cerebro.

El primer paso en la transducción del estímulo es la recepción del mismo por los nociceptores. Los nociceptores transmiten los estímulos mediante dos tipos de fibras llamados fibras Aδ o mielinicas y fibras C o amielinicas. Las fibras de tipo C responden a un rango amplio de estímulos nocivos tales como estímulos mecánicos, térmicos y químicos. Esto los convierte en receptores polimodales. Son fibras de conducción lenta por lo que se relaciona con el mantenimiento del dolor después de la remoción del estímulo como por ejemplo el dolor posterior a una quemadura. Por otro lado las fibras Aδ son fibras de respuesta rápida y su rol fisiológico se asocia al dolor agudo por la presencia de un estímulo nocivo sin importar el tiempo que permanezca^{10,11}.

Es necesario que el estímulo recibido por los nociceptores alcance un umbral de activación de los mismos para poder traducir el estímulo a una señal eléctrica. El dolor que no es puramente agudo y que genera una reacción inflamatoria, debido a que existe una lesión, produce una alteración en la nocicepción. Esto se debe a que la inflamación trae consigo a células del sistema inmune con el objetivo de proteger la integridad del tejido.

Cómo estas células realizan esta función se detallará más adelante, sin embargo es importante saber que una de las formas es secretando mediadores de la inflamación. Entonces las fibras C y las fibras Aδ que procesan el dolor sufren lo que se denomina sensibilización periférica: la presencia de sustancias alógenas y mediadores de la inflamación despolarizan los nociceptores dando como consecuencia la disminución del umbral de activación de los mismos¹⁰. Las consecuencias de esto son la alodinia y la hiperalgesia¹². El primero se caracteriza por una respuesta aumentada a un estímulo mecánico o térmico que normalmente no es doloroso mientras que el segundo se trata de la exacerbación de la respuesta ante un estímulo doloroso. Si bien es difícil diferenciar uno del otro mediante observación, es fácil notar que un animal dolorido responde a los estímulos de forma diferente a un animal sano. Por ejemplo, consideremos un estímulo térmico: aplicado en una zona sana puede ser perfectamente tolerado por determinada cantidad de tiempo antes de producir dolor; sin embargo al aplicar el mismo estímulo de igual intensidad en una zona inflamada, el tiempo necesario para que produzca dolor disminuye considerablemente.

La disminución en el umbral de activación de los nociceptores lleva a un constante tráfico de señales aferentes que contribuye de forma importante a la sensibilización del asta dorsal de la médula espinal¹³⁻¹⁵. En muchos modelos animales

de dolor crónico se ha visto un aumento en la activación de receptores NMDA y una expresión elevada de la subunidad AMPA indicando un alto nivel de actividad transmisora de señales¹. Las vías descendentes del dolor también influyen en la modulación de la nocicepción. La transición del dolor agudo al crónico se ve acompañado por cambios fisiológicos y moleculares en la médula medioventral que envía fibras excitatorias e inhibitorias al asta dorsal de la médula espinal. Después de producida la inflamación se producen cambios en receptores NMDA, AMPA, trkB, opioides y neurokinina-1¹⁶.

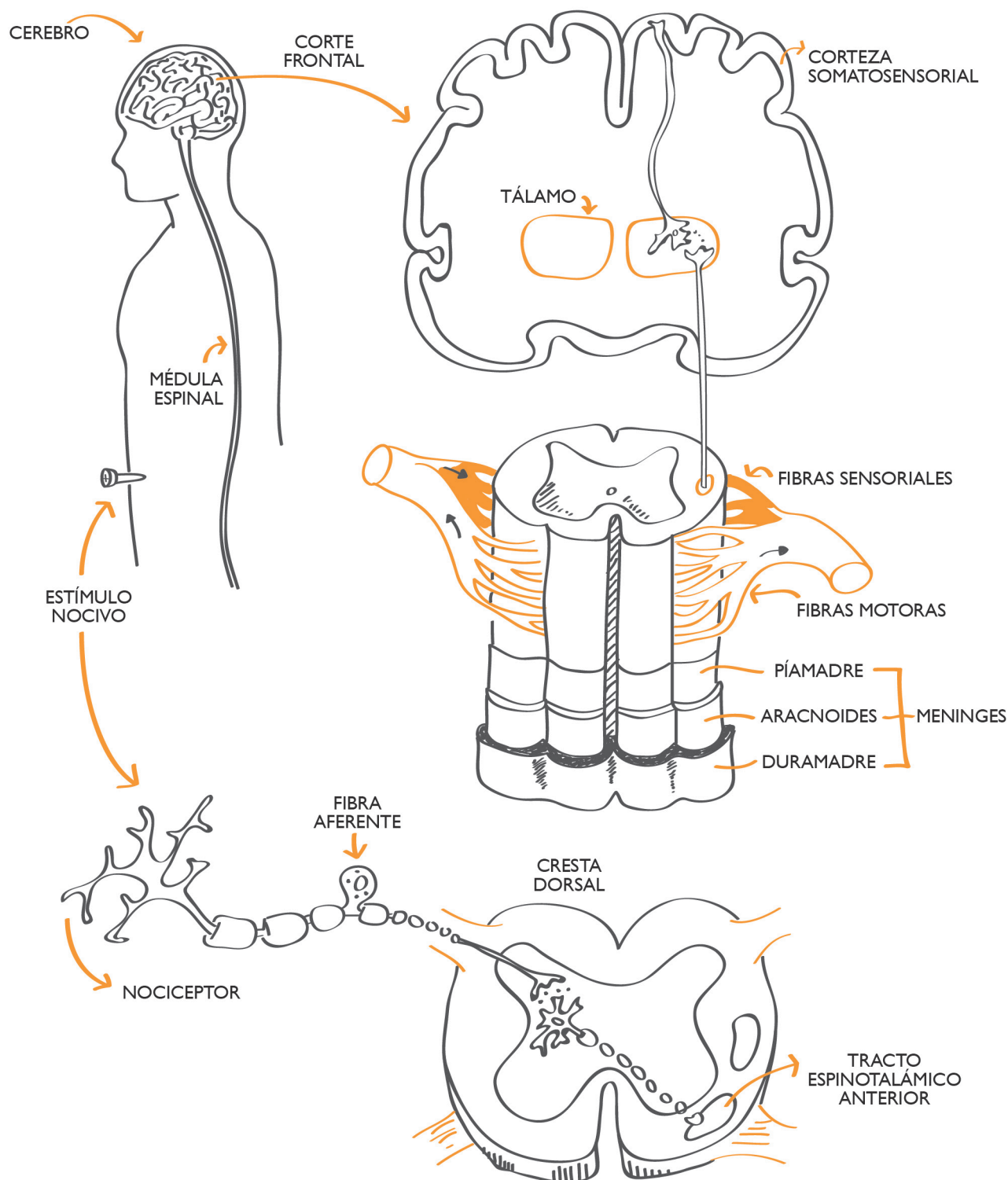


ILUSTRACIÓN 1. Esquema representativo de la percepción del dolor. Tras un estímulo nocivo los receptores del dolor traducen la señal dolorosa a una señal eléctrica mediante la generación de un potencial de acción. El mismo puede ser llevado por una distancia considerable hasta neuronas del SNC, pasando por ganglios de la raíz dorsal, luego por la cresta dorsal medular y por vías ascendentes (tracto espinotalámico anterior) hacia los núcleos supraespinales y espinales hasta llegar a áreas corticales asociadas al dolor.

Por lo tanto podemos decir que el dolor se procesa diferente acorde a la naturaleza de los receptores, al umbral de activación que presenten al momento de recibir el estímulo, a la activación (o no) de la médula espinal, además del componente subjetivo. Sin embargo resta considerar un factor importante. En condiciones normales, cuando ocurre una lesión que desata un proceso inflamatorio, el dolor se resuelve luego de transcurrido determinado tiempo como es en el caso de las quemaduras o lesión en los nervios por accidentes de tráfico. Este dolor puede persistir varios días después de la remoción del estímulo, observándose la alodinia y la hiperalgesia al igual que en el dolor crónico. Entonces cabe preguntarse: ¿qué diferencia a estos dos tipos de dolor? Los efectos en la alteración de la nocicepción del dolor que dura pocos días son protectores para el individuo, y si bien el dolor no finaliza rápidamente, el mismo se resuelve a medida que el tejido va sanando. Como ya se ha explicado, en ambos tipos de dolor hay una activación de células del sistema inmune y estas producen factores proinflamatorios para la recuperación del tejido¹⁷. En una situación de dolor inflamatorio existe un momento en el cual comienza la resolución de la inflamación y ocurre un cambio en el tipo de mediadores producidos: se deja de producir mediadores pro-inflamatorios y se comienza a producir mediadores pro-resolutorios como las resolvinas, las protectinas y lipoxinas. Como su nombre lo indica, estos mediadores promueven la resolución de la inflamación limitando la infiltración de células del sistema inmune y promoviendo la fagocitosis de células ya infiltradas. Como resultado la sensibilidad al dolor disminuye. Las lipoxinas y resolvinas actúan en distintos niveles celulares y tisulares con diferentes receptores (Ilustración 2).

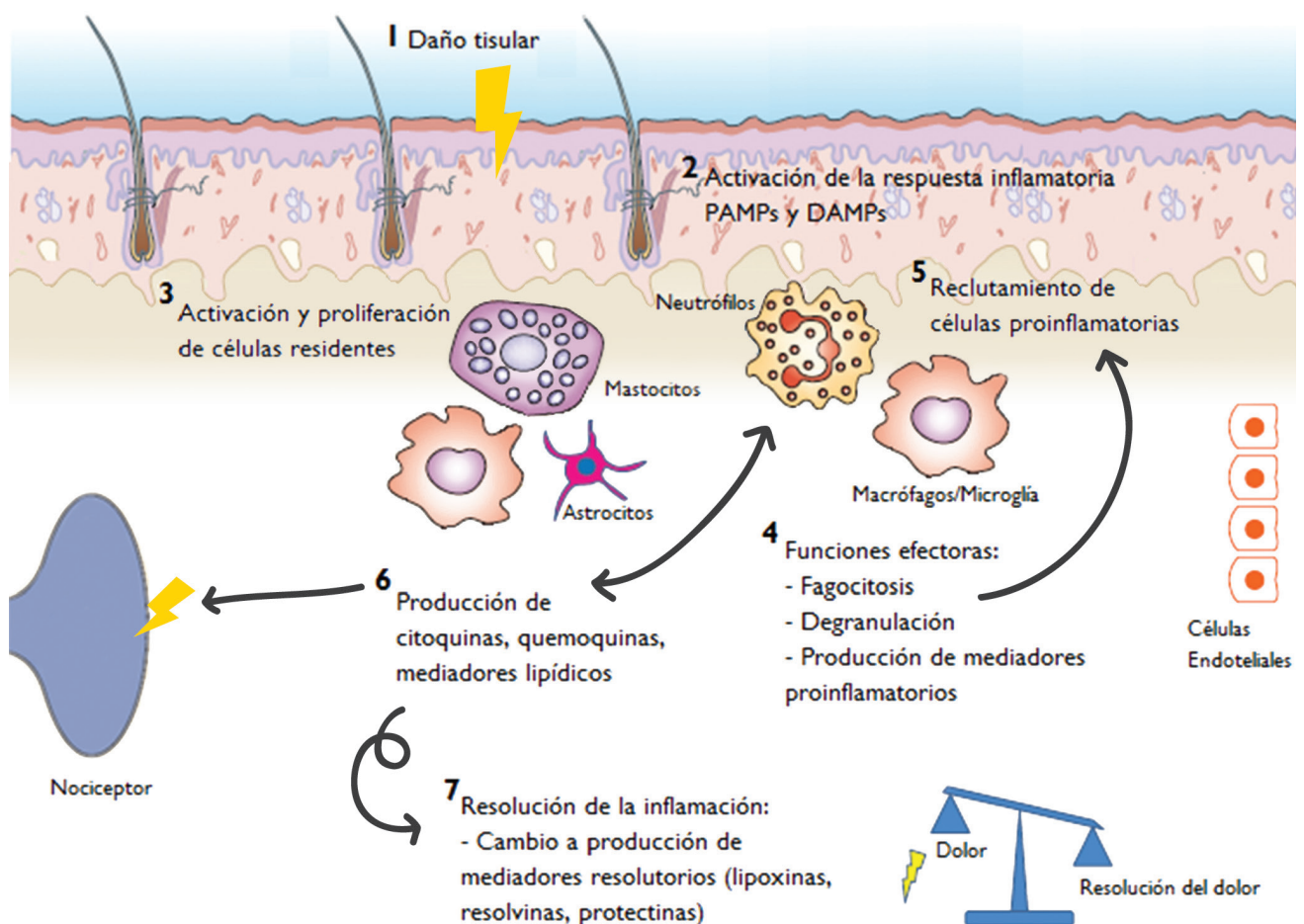


ILUSTRACIÓN 2. Esquema representativo de las etapas de una respuesta inflamatoria desencadenada ante un daño tisular. Al ocurrir un daño en un tejido como la piel (1) la respuesta inflamatoria se activa debido a la presencia de PAMPs y DAMPs (2). Esto lleva a una activación y proliferación de células residentes tales como los mastocitos y los macrófagos (3). Las funciones efectoras de estas células tras su activación incluyen la producción de mediadores proinflamatorios necesarios para la preservación del tejido (4) y para la migración de células al sitio de inflamación como los neutrófilos y macrófagos (5) que extravasan a través de las células endoteliales de los vasos sanguíneos. La producción de mediadores proinflamatorios produce el efecto indeseado de sensibilización periférica de los nociceptores (6). En el caso de una resolución normal del dolor estos mediadores promueven la producción de mediadores resolutorios que resuelven la inflamación (7), retornando el tejido a un estado normal. Sin embargo problemas en la resolución de la inflamación pueden llevar al dolor a permanecer en el tiempo, como en el caso del dolor crónico (8). Este tipo de procesos también se da en lesiones en el sistema nervioso central (SNC), por lo que en el esquema se pueden observar los astrocitos que secretan mediadores y la microglía (macrófagos del SNC). Adaptado de Ellis et al¹⁷, y Marchand et al¹⁸.

Se cree que la susceptibilidad a desórdenes inflamatorios crónicos puede resultar de defectos en los receptores, en las vías de señalización que utilicen o de la síntesis de novo de las moléculas pro-resolutorias¹⁹⁻²². En esta situación la función protectora del dolor hacia los individuos se pierde, dándose una percepción constante del mismo con varias consecuencias negativas para quienes lo padecen. Esta afección existe en el 20% de la población mundial aproximadamente y se asocia a varias patologías como la enfermedad inflamatoria intestinal, la cistitis intersticial, endometriosis, artritis, fibromialgia, depresión o cáncer. Dos consecuencias evidentes del dolor crónico son el impacto en la calidad de vida de quienes lo sufren así como los costos sanitarios elevados.

¿Cómo se estudia el dolor crónico?

El dolor crónico se caracteriza por su persistencia en el tiempo a pesar de la ausencia de un estímulo nocivo. Ejemplos de este tipo de dolor pueden ser las cefaleas, el dolor de espalda, dolor generado por lesión en un nervio o el dolor psicogénico entre otros.

Para obtener una aproximación biológica lo más cercana posible a la realidad del dolor crónico se utilizan modelos animales. Existen en primates y otros mamíferos como los gatos, aunque los modelos más utilizados son en murinos. Los modelos de dolor crónico son variados y se provocan de distintas formas, según la patología que se desee estudiar. En el estudio del dolor crónico inflamatorio se han producido modelos mediante la inyección de sustancias inmunogénicas tales como el adyuvante completo de Freund (ACF), la carragenina o LPS⁷ debido al tipo de dolor que generan: prolongado y estable por varios días.

Un modelo de dolor inflamatorio muy utilizado es el modelo por inyección de ACF intraplantar. El ACF es una emulsión estabilizada de aceite y agua que contiene además bacterias atenuadas por calor, generalmente de *Mycobacterium tuberculosis*²³. Se ha observado que tras la inyección intraplantar de ACF se produce una reacción inflamatoria fuerte y duradera con presencia de hiperalgesia térmica y mecánica y alodinia. En este modelo se ha descrito dolor desde las 6 horas post-inyección hasta los 14 días. Se ha observado que la inyección de ACF no altera morfológicamente la microglía aunque se observa una leve reactividad glial¹⁵. En la médula espinal se observa tanto una disminución de KCC2, un mediador de la inhibición sináptica, como un aumento en el tráfico de la subunidad NR2B del receptor de glutamato, principal neurotransmisor excitador del SNC. Por otra parte los marcadores de microglía Iba-1 y de macrófagos OX-42 no incrementan significativamente¹³. No se observan alteraciones en la expresión génica de los ganglios de la raíz dorsal¹ ni daño en neuronas motoras. Sin embargo se ha observado desmielinización de los axones cuando la inyección de ACF es en el nervio²⁴. En cuanto a la reacción inflamatoria, se observa edema con una gran cantidad de células típicas de la inflamación como neutrófilos y macrófagos¹⁵.

Una vez que se cuenta con un modelo se pueden medir parámetros que indiquen la presencia, ausencia y variación del dolor ante distintas situaciones o tratamientos utilizando tests estandarizados. Parámetros como la alodinia y la hiperalgesia se pueden cuantificar midiendo la sensibilidad térmica o algesimetría como en el test de Hargreaves⁵. En este test los animales se colocan en cubículos acrílicos que se encuentran sobre una base de vidrio el cual mantiene una temperatura constante. A través de este vidrio pasa un haz de luz calórico cuya fuente es activada por un operario (Ilustración 3). Se cuantifica el tiempo que el animal demora en levantar la pata, en ese momento se quita el estímulo. El tiempo que demora en levantar la pata a causa del dolor percibido por el estímulo térmico se denomina latencia de retirada y disminuye acorde aumenta el dolor (no en forma proporcional).

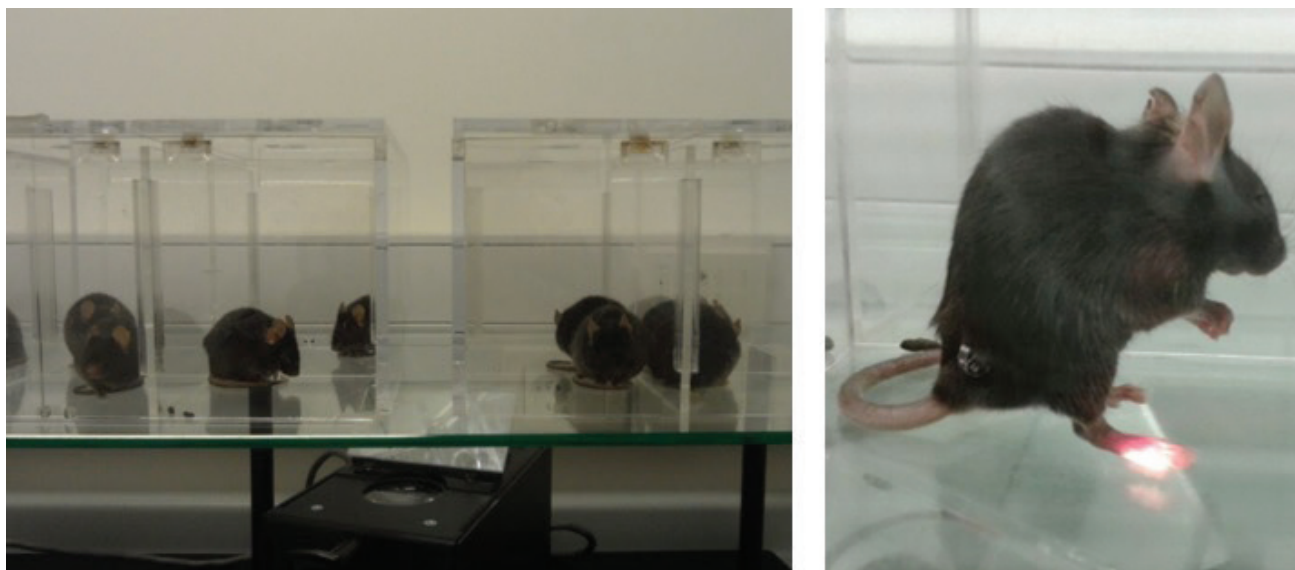


ILUSTRACIÓN 3. A la derecha observamos el equipo utilizado para realizar el Test de Hargreaves. Se observa la fuente de la luz colocada debajo del vidrio. Por encima se observan los cubos acrílicos donde se mantienen los ratones mientras se realiza el estudio. A la izquierda se observa un ratón con el haz de luz en su pata derecha.

Rol de células no neuronales en el dolor

Células del sistema inmune innato

El sistema inmune está conformado por un grupo de moléculas y de células que trabajan conjuntamente para proteger a los organismos y la integridad de sus tejidos. Comprende un conjunto de células que pueden ser tanto de origen mieloide (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y macrófagos) como de origen linfóide (linfocitos B, linfocitos T y células NK) y componentes solubles que circulan por la sangre y además se encuentran en el líquido intersticial.

La piel actúa como una interfase entre el huésped y el medio proveyendo de una barrera mecánica y biológica contra agentes físicos, químicos y patógenos. Posee dos compartimientos: la epidermis y la dermis, esta última posee capilares sanguíneos, vasos linfáticos y terminales nerviosas. Hay células del sistema inmune que son residentes de este tejido (como los macrófagos, los mastocitos y las células dendríticas) y su función principal es proporcionar una respuesta rápida ante la entrada de agentes patógenos externos²⁵. Pueden reconocer a los mismos mediante receptores de PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), los cuales son moléculas asociadas a patógenos como lipopolisacáridos bacterianos, flagelina, ácido lipoteicoico (bacterias gram positivas) o ARN doble cadena característico de algunos virus. Estas células también poseen receptores que reconocen DAMPs (Damage-associated molecular patterns), estos son productos de muerte celular (proteínas citosólicas o nucleares, material genético) lo que permite activar al sistema inmune innato sin que haya necesariamente un patógeno²⁶. Mecanismos para deshacerse de los patógenos una vez que han sido identificados pueden ser la fagocitosis (macrófagos, neutrófilos), la secreción de gránulos celulares que contienen enzimas y proteínas tóxicas (eosinófilos) o de agentes proinflamatorios tales como histamina o TNF- α (mastocitos) que cumplen funciones variadas, entre ellas la quimiotaxis de otras células del sistema inmune⁸. Como se explica en la sección 3, los agentes proinflamatorios que secretan estas células tienen efectos sobre los nociceptores influyendo en la nocicepción por lo que se ha observado su rol modulador en el dolor²⁷⁻²⁹.

Células del sistema nervioso

Las células de Schwann son la glía del Sistema Nervioso Periférico y, en su estado normal, proveen a la neurona de soporte trófico, así como de una vaina de mielina que asegura una rápida conducción de los potenciales de acción. Luego de una lesión en los nervios periféricos las células de Schwann se ven activadas y cambian drásticamente su fenotipo pudiendo ser capaces de proliferar, migrar, secretar quimioquinas, citoquinas y factores (TNF- α , IL-1 β , CCL2, IL-10 y Eritropoyetina (Epo)) y regular su producción¹⁴. Los factores secretados son necesarios para la degeneración Walleriana, un proceso en

el cual después de una injuria en el nervio los macrófagos fagocitan la mielina con el fin de regenerar los axones. También se ha demostrado, recientemente, que la microglía activada en la médula espinal cumple un importante rol en el mantenimiento y la inducción del dolor patológico, sobretodo en dolor neuropático¹⁵. Sin embargo en el dolor inflamatorio la reactividad glial es mucho menor. La activación de la microglía conlleva la producción de citoquinas y quimioquinas así como la expresión de proteínas de membrana. Estas proteínas son de carácter inmunológico: CD11b y c, CD45, CD40, CD86, MHC de clase II, receptores tipo Toll, receptores de Fc y de citoquinas. Estas células no fueron estudiadas en este trabajo.

Mastocitos

Los mastocitos son células de origen mieloide pertenecientes al sistema inmune innato. Se encuentran como residentes en potenciales sitios de infección tal como la piel, las vías respiratorias y el tracto gastrointestinal si bien se pueden ver en los nódulos linfáticos, bazo y sistema nervioso³⁰. Comúnmente se los conoce por su acción en la hipersensibilidad inmediata contribuyendo en el asma, dermatitis atópica y alergias³¹. Además cumplen un rol importante en la defensa del organismo contra parásitos³².

Sin embargo, recientemente se ha descubierto su importante rol en la inflamación: actúan generando mediadores y promoviendo la respuesta inflamatoria mediante el reclutamiento de células a los sitios de infección. Los mastocitos se encuentran frecuentemente co-localizados con fibras nerviosas. Cuando estos se activan producen y secretan histamina, serotonina, triptasa, TNF- α y NGF llevando a la activación del sistema nervioso y contribuyendo en reacciones de inflamación neurogénica³³. Varios estudios sugieren que la producción de NGF está involucrada en el mantenimiento de la sensibilización de los nociceptores y por lo tanto se vincula con la alodinia e hiperalgesia típicas del dolor crónico³⁴. Además se ha demostrado que las quimioquinas KC/CXCL1 and LIX/CXCL5 son esenciales para el reclutamiento de neutrófilos en inflamación, así como el receptor de quimioquinas CXCR1/2, expresado por macrófagos y mastocitos. La producción local de KC/CXCL1 y LIX/CXCL5 en respuesta a un antígeno precedió la producción de TNF- α y la inyección de KC/CXCL1 y LIX/CXCL5 llevó a la producción del TNF- α ; además el bloqueo del receptor de estas quimioquinas previno la extravasación de neutrófilos así como la producción de TNF- α .³⁵

Macrófagos

Los macrófagos son células de origen mieloide derivados de monocitos circulantes de la sangre, que migran de modo continuo hacia los tejidos, donde van a sufrir diferenciación. Constituyen una importante defensa en la inmunidad innata así como también en la inmunidad adaptativa. Junto con los granulocitos y las células dendríticas, los macrófagos se encargan de fagocitar tanto agentes patógenos como células infectadas, así como también participan en el mantenimiento de los tejidos eliminando células muertas y restos celulares. Los macrófagos funcionan, además, como células presentadoras de antígenos. Una función crucial de estas células es modular las respuestas inmunitarias: secretan proteínas emisoras de señales que activa otras células del sistema inmunitario y las reclutan hacia una respuesta inmunitaria.

Los macrófagos se diferencian en dos perfiles fenotípicos diferentes: proinflamatorios y antiinflamatorios³⁶. Se ha descrito el rol de los macrófagos proinflamatorios en varias enfermedades inflamatorias, tales como la arteriosclerosis, asma, artritis reumatoide, fibrosis, artritis reumatoidea y enfermedad de Crohn. Un ejemplo de lo anterior es la contribución de estos macrófagos presentes en enfermedades desmielinizantes crónicas, los cuales contribuyen a la desmielinización de los axones en la encefalomiелitis autoinmune experimental. A su vez se ha reportado el efecto anti inflamatorio de los macrófagos: el receptor inhibitorio CD200R que se expresa en macrófagos con fenotipo anti-inflamatorio previene el comienzo de la encefalomiелitis autoinmune experimental en ratones³⁷.

Efecto de las citoquinas y quimioquinas en el dolor

Tras la activación de las células del sistema inmunitario se produce la liberación de mediadores tales como citoquinas o quimioquinas las cuales son las responsables de la inflamación del tejido y de las características principales de la misma: calor, dolor, rubor y tumor. Al liberarse estas sustancias aumenta el flujo sanguíneo y la permeabilidad de los vasos sanguíneos así como la vasodilatación y por lo tanto la extravasación de células desde el flujo sanguíneo al sitio de infección. A su vez, determinadas citoquinas tienen propiedades quimioatrayentes, lo que causa el movimiento de células hacia el sitio de

infección, tanto de las células residentes del tejido como de las células que extravasaron. Las células que extravasan a los tejidos son en su mayoría granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y monocitos que se diferencian en macrófagos o en células dendríticas. También se da el escape de líquido hacia los tejidos, lo que explica la presión, aumento de la temperatura e hinchazón. El aumento de citoquinas y quimioquinas en el tejido actúa sobre las células presentes regulando la secreción de nuevas citoquinas y quimioquinas y, a su vez, actúan sobre receptores presentes en los nociceptores activando distintas cascadas. Las quimioquinas, citoquinas y factores más comunes presentes luego de daño tisular o daño en nervio son el factor de necrosis tumoral (TNF- α), la histamina, la interleuquina -1 β (IL-1 β), la interleuquina-6 (IL-6), el óxido nítrico (ON), la bradiquinina, el factor de crecimiento de nervios (NGF) y protones. Las citoquinas y quimioquinas, así como mediadores lipídicos secretados durante la respuesta inflamatoria tienen el efecto indeseado de la sensibilización de los nociceptores. Pueden incidir directamente sobre los receptores específicos presentes en los nociceptores o indirectamente mediante la producción de otros mediadores, como los prostanoïdes. Este evento sumado a la incorrecta resolución de la inflamación promueve cambios en la plasticidad sináptica, sensibilizando al SNC y resultando en dolor crónico¹⁷.

Los mecanismos que regulan el dolor son complejos y los tratamientos nociceptivos no han resultado eficaces debido a la gran cantidad de factores a tener en cuenta. Se ha considerado tratamientos farmacológicos y quirúrgicos sin resultados favorables. Sin embargo, la mayoría de los estados de dolor persistentes son impulsados y mantenidos por actividades anormales en los nociceptores periféricos, por lo que dirigir el tratamiento a blancos periféricos puede ser prometedor²⁷. Se debe considerar que las citoquinas y quimioquinas proinflamatorias que generan la sensibilización periférica son necesarias para la sanación correcta del tejido, por lo tanto, terapias analgésicas que utilizan como target la respuesta inflamatoria periférica deberían apuntar a modular la misma y no a suprimirla.

Inmunoreceptores

La activación o inhibición de muchas de las células del sistema inmunitario depende de un balance entre señales positivas y negativas captadas por receptores, generalmente de membrana. La estructura de los inmunoreceptores determina fuertemente sus propiedades funcionales. Los receptores inhibitorios cuentan con motivos de inhibición basados en tirosina (o motivos ITIM) en sus largas colas citoplasmáticas. Una vez que interactúan con sus ligandos los motivos de tirosina se fosforilan reclutando proteínas Src lo que desencadena una cascada intracelular de señales que promueven la inhibición celular. Por el contrario los receptores activadores necesitan asociarse con polipéptidos adaptadores transmembrana especializados en la transducción de señales debido a que carecen de unidades de señalización. Esta asociación resulta en la fosforilación de motivos activadores basados en tirosina (ITAM) presentes en las colas de los polipéptidos adaptadores, la cual es necesaria para el reclutamiento de kinasas que estimulan la diferenciación celular, el crecimiento y supervivencia, migración, fagocitosis, producción de citoquinas y en el caso de los mastocitos la degranulación³⁸.

Familia de inmunoreceptores CD300

La familia de los receptores humanos CD300 es un grupo de proteínas transmembrana que incluye seis moléculas que se agrupan en un cluster del cromosoma 17 (17q25.1)³, en su mayoría expresadas exclusivamente por la línea mieloide. Una de las moléculas (CD300a) es expresada también en las células linfoides. La combinación de estos receptores modula diferencialmente la señalización intracelular pudiendo regular la activación de las células mieloides. Dentro de esta familia los receptores CD300b, c, d, e y g son activadores y el CD300a es inhibidor. Por otra parte, el inmunoreceptor CD300f cumple una función dual pudiendo activar e inhibir las respuestas celulares. A su vez, se ha publicado que la familia de receptores CD300 tiene la capacidad de formar complejos entre los receptores integrantes de la familia. Se unen extracelularmente formando homo y hetero-complejos señalizadores lo cual puede modificar las propiedades señalizadoras de los receptores individuales. Este aspecto hace que los receptores CD300 representen un mecanismo de las células mieloides para controlar las respuestas inmunes en intensidad y duración³⁸. Las citoquinas proinflamatorias pueden alterar la expresión de los receptores de la familia CD300, así como los receptores pueden actuar alterando la producción de citoquinas proinflamatorias y la migración celular. Esto muestra una fuerte correlación con la regulación de respuestas inflamatorias lo que le asigna, a la familia de receptores CD300, un posible lugar en desórdenes relacionados con la inflamación³⁹, incluida la inflamación crónica.

CD300f/IREMI/CLMI

El receptor CD300f o IREMI contiene una cola citoplasmática larga con una variedad de motivos tirosina que pueden producir señales inhibitorias mediante el reclutamiento de la fosfatasa SHP-1 y con dos motivos de unión a la PI3 quinasa por lo que puede producir señales activadoras⁴⁰. El receptor presenta un ortólogo (CLMI) en ratón que se expresa en las células mieloides, incluyendo mastocitos y linfocitos B. En distintas investigaciones científicas se han mostrado los efectos del CLMI en situaciones diversas de inflamación y su función como modulador. En ratones Knockout (KO) para CLMI, se observó la exacerbación de respuestas alérgicas incluyendo anafilaxis, inflamación de las vías respiratorias y dermatitis atópica, si bien se observó un desarrollo de mastocitos normal⁴¹. Resultados de nuestro laboratorio mostraron que la sobreexpresión de CD300f genera un efecto neuroprotector después de daño cerebral agudo en rata⁴. Esto se ha confirmado en un modelo de trauma cerebral. El CLMI actúa como un regulador negativo de la actividad celular mieloide reprimiendo la liberación de citoquinas y especies reactivas del oxígeno y así regulando la inflamación y desmielinización en el SNC⁴². Resultados del nuestro laboratorio muestran que una proteína de fusión soluble generada para bloquear la interacción entre el receptor y sus ligandos reduce el grado de regeneración axonal cuando es inyectada en nervio ciático luego de una lesión nerviosa.

Hasta la fecha no queda claro cuál es el ligando de CD300f. Se ha observado que se une fuertemente a células apoptóticas aunque su ligando puede encontrarse en la superficie de células vivas. Debido a esto se ha hipotetizado que un ligando posible para el CD300f es la fosfatidilserina (PS) ya que cuando se encuentra en la capa externa de la membrana plasmática es un marcador de apoptosis o de activación celular. Estos resultados fueron apoyados por el bloqueo entre CD300f y PS al colocar en el medio Anexina V, una proteína que se une específicamente a la PS. Se observó también que células transfectadas con CD300f poseen una capacidad de fagocitar células apoptóticas de un 30 a un 50% mayor que células control. La presencia de una CD300f soluble interfirió con la fagocitosis de células apoptóticas⁴³. Otro ligando que ha sido propuesto son las ceramidas y esfingomielinas⁴⁴. Sin embargo restan más estudios para confirmar si CD300f tiene un ligando único o varios.

Aproximaciones terapéuticas para el dolor crónico

Los tratamientos existentes para el dolor crónico no logran una mejoría adecuada en una gran cantidad de afectados. Debido a esto no sólo se han cambiado los blancos terapéuticos sino que también se ha comenzado a buscar alternativas en las formas de aplicar los tratamientos. En parte, esto se debe a las limitaciones de las terapias farmacológicas como la tolerancia a los fármacos por parte de los afectados y el potencial abuso de las mismas. Una técnica que ha demostrado su eficacia en estudios preclínicos y clínicos en fase I es la terapia génica. Esta terapia es bien tolerada por los pacientes y ha disminuido el dolor de pacientes sustancialmente⁷. A continuación se explicará cómo funciona la terapia génica y los aspectos más relevantes de la misma.

Terapia génica

La terapia génica se basa en la introducción de genes al organismo, o la regulación de la expresión de genes endógenos. Se trata de la adición, sobre-expresión, alteración, corrección o bloqueo de la expresión de determinados genes, proporcionando una amplia gama de tratamientos para muchas patologías^{45,46}. El material genético debe ser introducido a las células eficientemente, por lo que es importante contar con los vehículos adecuados⁴⁷.

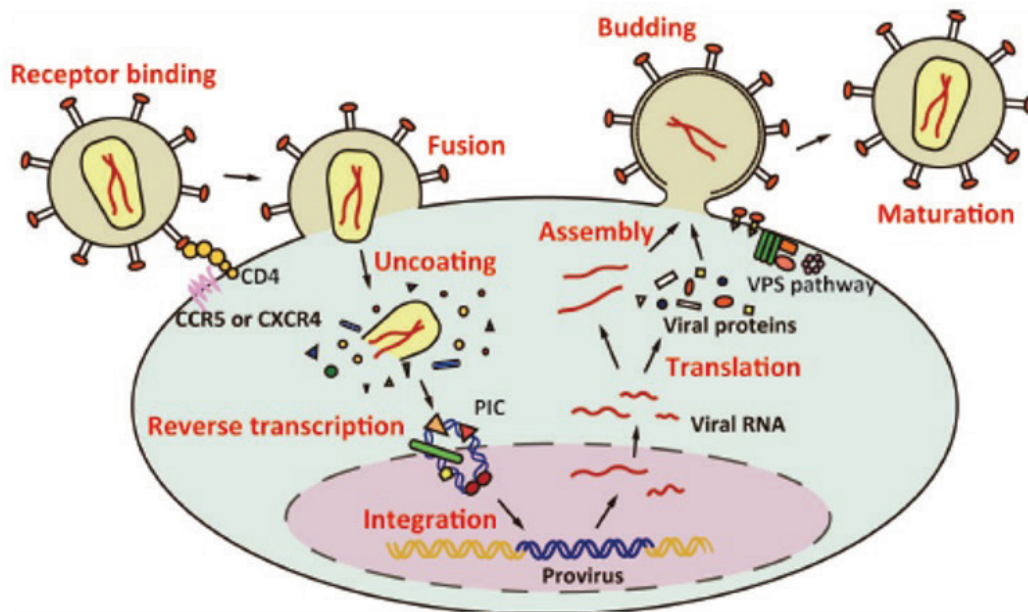
Vectores virales

Los virus pueden ser considerados como una cápsula lipoproteica que contienen información genética y que son capaces de entregar su material genético al núcleo de la célula infectada por los mismos. Desde este punto de vista se puede considerar que son ideales para la terapia génica. El éxito de un vector radica en distintas características que son importantes tener en cuenta: su capacidad para incorporarse al tejido de interés, el tamaño del vector, las interacciones con otros componentes tisulares y la respuesta inmune que puede generar el mismo⁴⁶.

Lentivirus y VIH-1

El género lentivirus pertenece a la familia Retroviridae, su material genético es ARN simple hebra de sentido positivo conteniendo dos copias del mismo en complejo con proteínas de la nucleocápside (NC). Sus viriones miden entre 80 y 120 nm de diámetro y se componen de una cápside proteica que contiene las enzimas transcriptasa reversa, integrasa y proteasas requeridas para la infección viral. Son virus envueltos, por lo que tienen una bicapa lipídica de origen celular que los rodea. Insertadas en la misma existen glicoproteínas de la envoltura viral responsables del reconocimiento específicos de receptores celulares necesarios para la infección viral: gp120 y gp41.

ILUSTRACIÓN 4. Representación esquemática de la replicación del retrovirus VIH-I. La unión del virus a la célula se da mediante el receptor



celular CD4, lo que permite la fusión de la membrana celular y la envoltura viral. Luego de su entrada el ARN es liberado al citoplasma donde se da la retrotranscripción. Se da la formación de un complejo PIC que ingresa al núcleo y media la integración del ADN viral al ADN celular. El ADN es luego utilizado como molde para la producción de ARNm y posterior síntesis de proteínas para la formación de nuevos viriones. Extraído de Suzuki et al. 2004.

HIV-I comienza su proceso de infección con el reconocimiento de gp120 con un receptor el cual generalmente es CD4. A su vez existen correceptores necesarios para una infección exitosa. La envoltura del virus se fusiona con la bicapa lipídica celular permitiendo la entrada de la cápside al citoplasma celular. Una vez ingresada a la célula, el ARN es liberado al citoplasma celular donde se realizará la retrotranscripción del ARN a ADN; se formará entonces un complejo ADN-nucleoproteínas denominado PIC el cual se transloca al núcleo de la célula mediando la integración del ADN viral al genoma celular junto con la integrasa.

La integrasa, la transcriptasa reversa y las nucleoproteínas son introducidas a la célula junto con el ARN viral en la infección. La integración del ADN viral al ADN celular puede darse en diversos lugares del genoma de la célula huésped; una vez integrado el ADN proviral se replica junto con el ADN celular, sirviendo además como molde para la síntesis de ARNm viral. Los ARNs producidos mediante la replicación del genoma celular son transportados fuera del núcleo, donde serán traducidos a proteínas virales que serán utilizadas para producir nuevos viriones⁴⁸ (Ilustración 4).

Organización del genoma de HIV-I y función de las proteínas de origen viral

Las dos cadenas de ARN idénticas contienen los genes: gag, pol, env y genes accesorios. Las proteínas producto de la transcripción de estos genes sufren proteólisis, lo cual tiene como resultado varias proteínas a partir de una. La proteína Gag dará lugar a las proteínas de la matriz (MA), de la cápside (CA) y de la nucleocápside (NC); la proteína Pol producirá las proteasas (PR), la transcriptasa reversa (RT) y la integrasa (IN). Por último la proteína Env dará lugar a las proteínas de superficie (SU) y las proteínas transmembranas (TM). Los genes accesorios regulan y coordinan la expresión del virus y

tienen funciones importantes en el escape a la respuesta inmune (Tabla I).

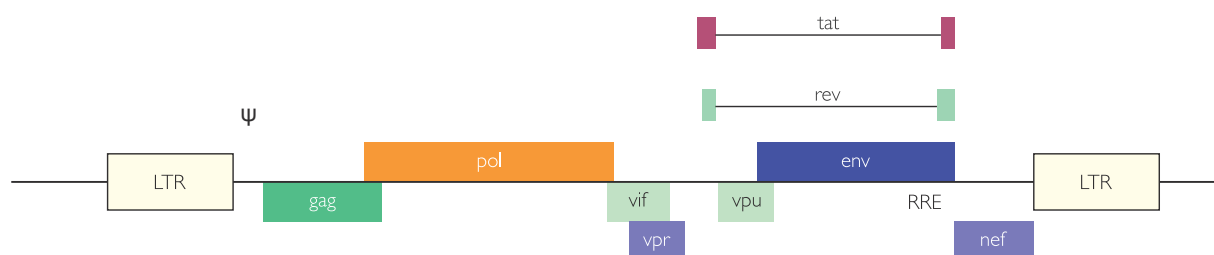
Gen	Proteína	Función
Gag	Pr55	Dirige el ensamblaje de los viriones; poliproteína precursora de las proteínas de la nucleocápside: matriz (MA o p17), cápside (CA o p24), nucleocápside (NC o p9) y p7
Pol	Pr160	Poliproteína precursora de la enzimas virales: proteasa (PR o p10), retrotranscriptasa o RNasa-H (RT o p51/p66) e integrasa (IN o p32)
Vif	P23	Interviene en la decapsidación del virión; limita el efecto antiretroviral de la proteína celular APOBEC3G al favorecer su degradación; participa en la decapsidación
Vpx	P16	Permite que el DNA viral llegue al núcleo celular
Vpr	P15	Ayuda a detener el ciclo celular y evitar la proliferación de las células; permite que el DNA viral llegue el núcleo celular
Tat	P14	Transactivador transcripcional: se une a TAR y a factores celulares promoviendo la elongación y la formación de complejos de iniciación
Rev	P19	Transcativador post-transcripcional: se une a RRE y a factores celulares regulando el “splicing”, el transporte al citoplasma y la traducción de los transcritos
Vpu	P16	Induce la degradación de la moléculas de CD4; forma poros transportadores de iones que incrementan la liberación de virus
Env	Gp160	Secuestra las moléculas de CD4 a nivel del retículo endoplasmático; poliproteína precursora de las proteínas de le envoltura
Nef	P27	Acelera la endocitosis y subsecuente degradación de las moléculas de CD4 así como las moléculas del MHC de tipo I y II; interviene en la decapsidación; favorece la transcripción mediada por el intensificador celular NF-κB

TABLA I. Genes y proteínas que codifican en HIV-I. Adaptado de Luciw, 1996 y Sierra et al, 2005.

Los genes accesorios son el factor de infectividad del virión (vif), la proteína viral r (vpr), la proteína viral u (vpu), Tat y Nef. Tat y Nef regulan los niveles de la expresión génica del HIV a nivel transcripcional y postranscripcional respectivamente (Ilustración 5). Tat aumenta drásticamente la transcripción del HIV mientras que Rev promueve la acumulación citoplasmática de transcritos virales que dan lugar a las proteínas virales tardías, una vez que alcanza una concentración umbral.

Además se sabe que los genes estructurales se expresan únicamente en presencia de Tat y Rev, cuando se producen partículas virales nuevas.

ILUSTRACIÓN 5. Organización del genoma de VIH-I. Adaptado de Ruchansky et al. 2009.



Aplicación de los lentivirus en terapia génica

Los lentivirus son frecuentemente utilizados para terapia génica, siendo los más utilizados los derivados del virus de la inmunodeficiencia humana del tipo I (HIV-I). Hay 89 ensayos clínicos realizados con lentivirus, algunos ya finalizados (Ilustración 5). Esto se debe a su elevada eficiencia de transferencia génica, además de su capacidad para mediar una expresión del transgén estable y duradera. Un dato interesante es que este tipo de vectores son capaces de transducir células no replicativas⁴⁹. Eso se ve facilitado por sus proteínas integrasa, vpr, proteína de matriz y por el tracto de polipurina presente en su genoma⁵⁰⁻⁵³.

Tipos de vectores utilizados en ensayos clínicos de terapia génica

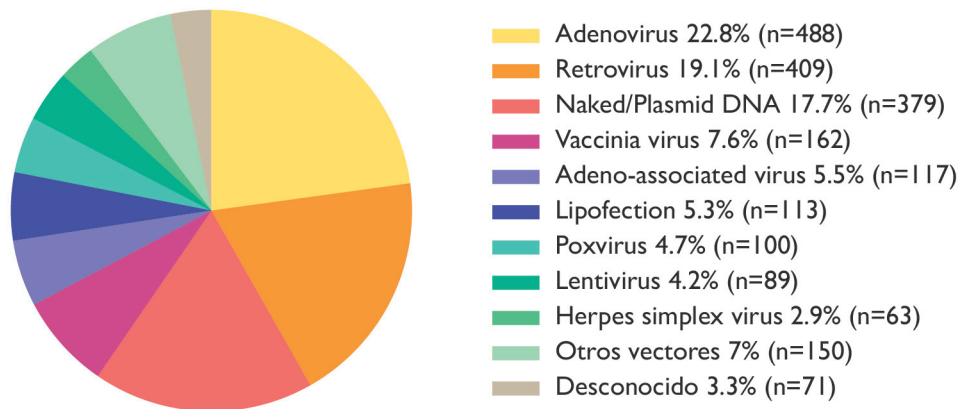


ILUSTRACIÓN 6. Porcentaje de los vectores utilizados en ensayos clínicos en terapia génica. Extraído de The Journal of Gene Medicine.

Bioseguridad y uso de LVs derivados de HIV-1

Para poder utilizar un vector proveniente del virus de HIV-1 se deben tomar precauciones importantes para no poner en riesgo la salud de los operarios ni de quienes reciben el tratamiento. Se utiliza entonces un sistema deficiente en replicación, se eliminan genes necesarios para la autopropagación y se excluyen del empaquetamiento los genes infecciosos asociados con patologías (accesorios). Este sistema se logra dividiendo los genes necesarios para crear una partícula viral completa en diferentes plásmidos. Se producen, entonces, un plásmido con el transgén de interés que además posee la secuencia de empaquetamiento y un plásmido denominado Helper el cual contiene las secuencias de las proteínas estructurales. Se ha observado que estos plásmidos pueden recombinar dada la homología de los LTR en los extremos 5' y 3'; esto se convirtió en un problema debido a que si el plásmido Helper adquiere por recombinación la secuencia de empaquetamiento se podrán formar partículas virales que contengan la información genética de los genes gag, pol y env. Como consecuencia se obtendrán partículas virales infecciosas. La solución a esto fue dividir el plásmido que contiene los genes estructurales en varios plásmidos, disminuyendo la probabilidad de recombinación, y por lo tanto de obtener partículas replicativas y competentes (Ilustración 7).

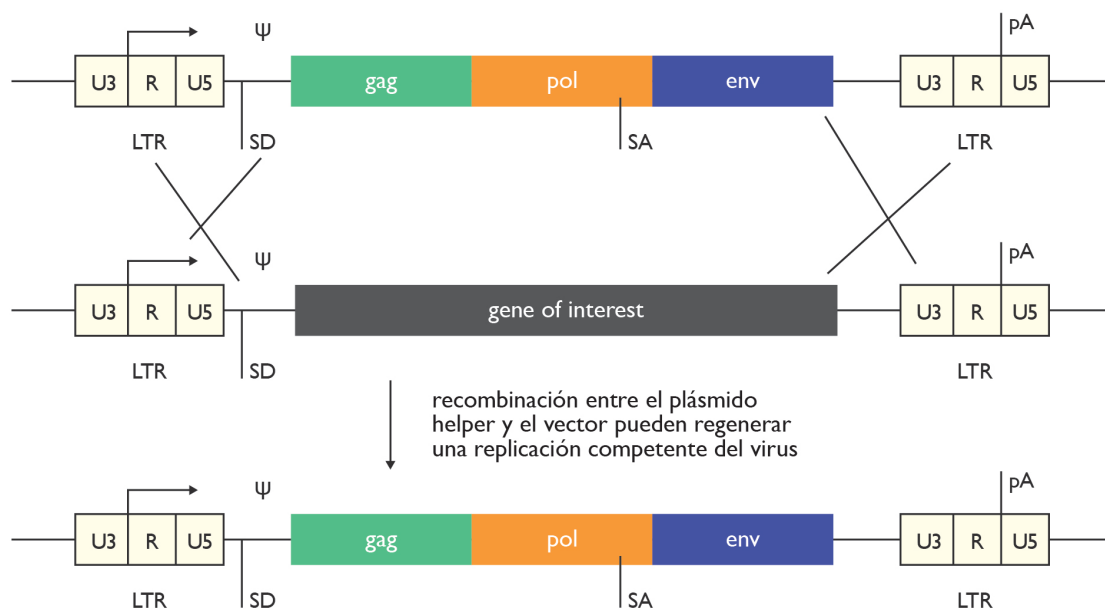


ILUSTRACIÓN 7. Mecanismo de recombinación entre el plásmido helper y el plásmido con la secuencia de empaquetamiento provocando la generación de partículas replicativas competentes.

A partir de esto se han creado distintos niveles de bioseguridad de los lentivirus utilizados. Los lentivirus de primera generación se trata de un sistema de tres plásmidos: el primero contiene el transgén de interés junto con la señal de empaquetamiento; el segundo contiene el gen que codifica para las proteínas de envoltura y el tercer plásmido contiene el resto de los genes que codifican para HIV-1 (no sólo gag y pol, sino que contiene además los genes accesorios).

En el sistema de vectores de segunda generación se utilizan también tres plásmidos, pero difieren de los vectores de primera generación en que se han eliminado los genes accesorios del plásmido que contiene los genes gag y pol. Sin embargo los genes tat y rev se mantienen. En los vectores de tercera generación se utilizan cuatro plásmidos. En el plásmido que contiene el transgén de interés se elimina la región 3' del LTR ($\Delta U3$) y se cambia la región U3 del 5'LTR por el promotor del CMV (citomegalovirus), habilitando la producción de LVs independiente de Tat. Al eliminar tat y nef se evita, a su vez, la respuesta celular a proteínas replegadas (UPR) en la cual la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo plasmático genera un stress que puede terminar en la muerte celular⁵⁴.

Por lo tanto en el plásmido que contiene los genes gag y pol se elimina tat y el gen rev se coloca en un cuarto plásmido. Los vectores lentivirales de tercera generación conservan sólo 3 de los 9 genes del HIV-1, lo que le proporciona ventajas en cuanto a bioseguridad, al igual que la separación de los genes en distintos plásmidos⁵⁵ (Ilustración 8).

A

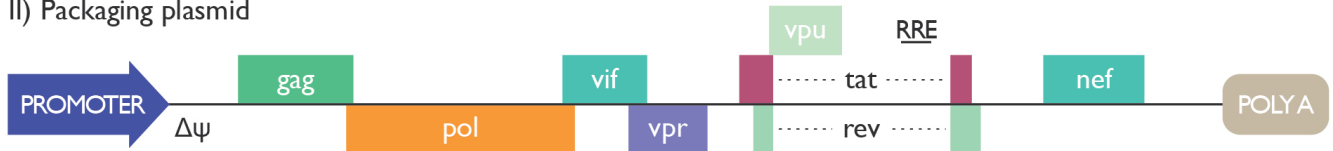
I) Transfer vector plasmid



III) Envelope expressing plasmid



II) Packaging plasmid



B

I) Transfer vector plasmid



III) Envelope expressing plasmid



II) Packaging plasmid



C

I) Transfer vector plasmid



III) Envelope expressing plasmid



II) Packaging plasmid



III) Rev Expressing plasmid



ILUSTRACIÓN 8. Diferentes tipos de construcciones de LVs acorde a la bioseguridad que presenten. Las partículas lentivirales de primera generación (A) son producidas por 3 plásmidos separados que codifican para el genoma del vector VIH-I excepto para los genes env. En los LVs de segunda generación se remueven o se mutan los genes accesorios: vif, vpr, vpu y nef (B). En los LVs de tercera generación la unidad activadora/promotora es eliminada de la región 3'LTR ($\Delta U3$) en los plásmidos de transferencia. La región U3 del 5'LTR es remplazada por el promotor de CMV, posibilitando la producción de LVs independientes de Tat. LTR: Long Terminal Repeats, Ψ : Señal de empaquetamiento, RRE: Elemento de respuesta a Rev. Tomado de Susuki et al. 2011.

OBJETIVOS

Objetivos Generales

El objetivo general de este trabajo es estudiar el papel del inmunoreceptor CD300f en el desarrollo y mantenimiento del dolor crónico. Nuestra hipótesis es que la modulación del CD300f puede tener efectos sobre la sensibilidad nociceptiva debido a su participación en algunos estados inflamatorios. Para evaluar esto se utilizará un modelo de dolor crónico murino que consiste en la inyección de ACF intraplantar. A partir de este modelo se caracterizará la expresión del inmunoreceptor a nivel periférico mediante inmunohistoquímica y la población de mastocitos presente en la inflamación. A su vez se evaluará el efecto de su modulación y cómo afecta la sensibilidad nociceptiva mediante dos estrategias: el bloqueo del ligando de CD300f mediante la inyección de una proteína de fusión y por último la sobreexpresión del CD300f utilizando LVs (LVs).

Los resultados de este trabajo nos permitirán evaluar al CD300f como diana terapéutica para el dolor crónico.

Objetivos específicos

Descripción del modelo de dolor crónico y expresión de CD300f en el mismo

Se describirá el modelo de dolor crónico utilizando algiesimetría térmica (test de Hargreaves) y se evaluará la población celular a distintos tiempos de producida la inflamación (6, 24 y 48 horas). Se realizará tinción de Nissl para contar los mastocitos y se realizará inmunofluorescencia para evaluar la presencia del inmunoreceptor.

Evaluación del efecto de la modulación del inmunoreceptor sobre la nocicepción

Se utilizará una proteína de fusión que bloquee la unión entre el receptor y su ligando. Se inyectará la proteína de fusión 3 horas después de la inyección de ACF y se evaluará la algiesimetría térmica. Esperamos que el bloqueo del ligando genere una sensibilidad nociceptiva mayor. Por otro lado utilizaremos vectores lentivirales integrativos que sobreexpresen al inmunoreceptor. Se inyectarán los LVs 3 horas antes de la inyección con ACF. Posterior al tratamiento se evaluará la algiesimetría térmica. Esperamos ver que la hiperalgesia térmica sea menor en los ratones con éste tratamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y modelo de dolor crónico inflamatorio

Todos los animales utilizados fueron ratones adultos (8 a 10 semanas; sexo indiferente) de la cepa C57BL6 criados en el bioterio libre de patógenos del Institut Pasteur de Montevideo. Los protocolos fueron autorizados por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del Institut Pasteur de Montevideo. Se utilizó el modelo de dolor crónico inflamatorio provocado mediante una inyección de Adyuvante Completo de Freund (ACF). La inyección fue de 20 µl de (1mg/ml; Sigma) intraplantar.

Algesimetría térmica

El dolor se evalúa mediante el test de Hargreaves⁵ por el cual se mide la sensibilidad térmica. Los animales se colocan en cubículos acrílicos que se encuentran sobre una base de vidrio el cual mantiene una temperatura constante; a través de este vidrio pasa el haz de luz cuya fuente es activada por un operario. Se cuantifica el tiempo que el animal demora en levantar la pata, en ese momento se quita el estímulo. Previo a la medición de la algesimetría los animales se aclimatan durante 1 hora en el mismo sitio. Es importante mantener constantes la temperatura y humedad del cuarto donde se realiza el experimento, ya que son factores que pueden modificar las latencias.

El haz de luz puede ser regulado por el operador para que las latencias de retirada basales se encuentren entre 8 y 12 segundos, que es lo considerado como estándar. Cuando el haz se emite por 20 segundos se corta automáticamente para prevenir daño tisular. Las latencias de dolor varían entre 1 y 6 segundos aproximadamente. Se registran cuatro latencias por pata: ipsi y contralateral de cada animal. Para procesar los datos se realiza un promedio de los valores basales de cada grupo de ratones y se normalizan los valores de cada grupo de acuerdo al basal correspondiente según la fórmula:

$$\text{Latencia normalizada} = \frac{\text{Valor de la latencia}}{\text{Latencia promedio del basal}} \times 100$$

Procesamiento de muestras

Para estudiar los tejidos en los diferentes modelos es necesario preservarlos tanto molecular como morfológicamente de tal forma que sean similares al estado in vivo. Estas características son bien mantenidas al fijar los tejidos debido a que se evita la autólisis del tejido muerto por las enzimas intracelulares y la putrefacción por acción bacteriana. La solución fijadora utilizada fue paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato 0.1M, pH=7,4; el PFA actúa como conservante y además no interfiere en las tinciones a utilizar posteriormente. Para la fijación de los tejidos se realizó la técnica de perfusión transcardíaca la cual se basa en la utilización del sistema circulatorio del animal como medio para transportar la solución fijadora. De esta forma, los capilares sanguíneos transportan la solución fijando a las células circundantes (Ilustración 9). Previamente al PFA se limpió el sistema circulatorio con PBS para evitar trombos que impidan una fijación correcta de los tejidos. Se utilizó el ventrículo cardíaco izquierdo para introducir el PFA por acción de un sistema de jeringas y se corta la aurícula derecha por donde se desagota la solución fijadora una vez recorrido el sistema circulatorio.

Posteriormente al fijado, se procedió a la disección de piel ipsi y contralateral. Los tejidos fueron mantenidos en PFA por 4 horas y luego preservados en una solución crioprotectora de sacarosa al 30% durante 48 - 72 horas. Luego se incluyó las muestras en Tissue-Tek® y se congelaron en nitrógeno líquido. Para el corte de las muestras se utilizó el criostato Leica CM1850 UV. La piel fue cortada a 20 µm. Se recogieron muestras en portaobjetos y se conservaron a -20 °C.

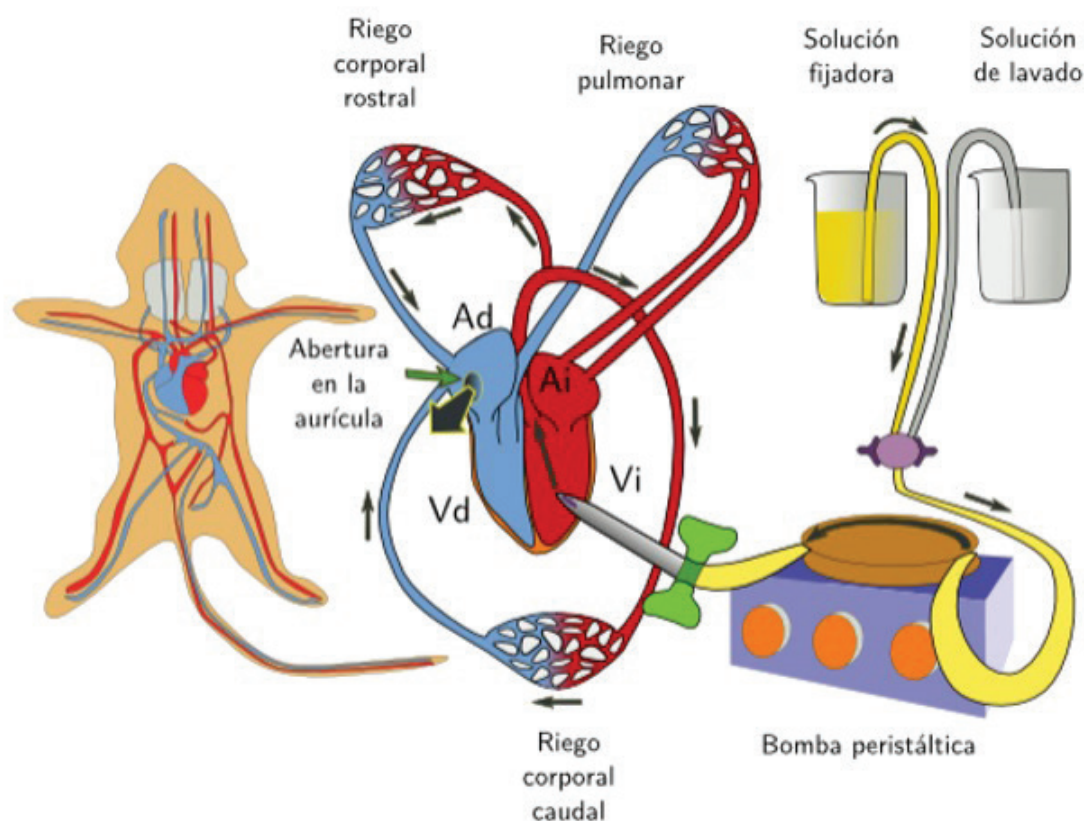


ILUSTRACIÓN 9. Esquema representativo de la perfusión transcárdica.

Tinción con Azul de Toluidina

Para visualizar mastocitos se utilizó la tinción de Azul de Toluidina que tiñe estructuras basófilas como los gránulos de los mastocitos y la cromatina. Se realizó una puesta a punto de la técnica en la cual se probaron distintos tiempos de tinción: 30 minutos, 1 hora y 2 horas. La solución se preparó mezclando el buffer Walpole y agua con azul de toluidina. El buffer Walpole consiste en 3 partes de ácido acético 0,2 M y 2 partes de acetato sódico 0,2 M. La solución final consta de 100 ml del buffer Walpole y 20 ml de colorante en agua (concentración final del colorante 1%).

Inmunofluorescencia

Se realizó inmunofluorescencia para detectar la proteína CD300f (tanto humana como murina), GFP y enzimas de mastocitos. Los anticuerpos y las concentraciones utilizadas se muestran en la tabla 2.

Para CD300f murino (en portaobjetos) se utilizó un kit de amplificación de señal con tiramida. Primero se lavó el tejido con PBS con el objetivo de limpiar el excedente de TissueTek en el que se encontraba inmerso y se incubó con solución de bloqueo (PBS-Fetal Bovine Serum (FBS) 10%) por 1 hora a temperatura ambiente. Se bloqueó la peroxidasa endógena y se lavó el tejido nuevamente con PBS-Tritón (PBS-T) 1%. Se coloca el anticuerpo primario over night (ON) a 4°C. Luego de los lavados con PBS-T se coloca un anticuerpo biotinilado y se incuba por 1 hora y 30 minutos. Luego se coloca el conjugado HRP 1 hora y una vez finalizada la incubación se lava el tejido y se incuba con la solución tiramida biotinilada por 10 minutos. Luego se colocó la Streptavidina 488 por 1 hora y se incuba con DAPI por 5 minutos y se lava nuevamente con PBS. Estos pasos se realizan a temperatura ambiente. Se utilizó Mowiol como medio de montaje para la muestra.

Para la inmunofluorescencia de mastocitos, GFP y CD300f humano en portaobjetos se realizó el siguiente protocolo: Se bloquea la muestra por 1 hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo. Se incubó con los anticuerpos primarios over night (ON) a 4°C. Se lava el tejido con PBS-T 1% y se coloca el anticuerpo secundario, incubando por 1 hora a

temperatura ambiente. Luego de los lavados se coloca DAPI por 5 minutos y se monta con Mowiol. Para la inmunofluorescencia de GFP y CD300f humano en cultivo en placa se realizó el mismo protocolo aunque se fijó las células con paraformaldehído al 4% por 15 minutos previo a la incubación con el anticuerpo primario y se mantuvo las células en PBS-azida 0,05% hasta su observación en el microscopio.

	Dilución	Fabricante
Anticuerpos primarios		
MCT (mastocitos)	1:500	
C-Kit (mastocitos)	1:500	Santa Cruz
GFP	1:500	Invitrogen
CD300f murino	1:200	R&D
CD300f humano	1:100 in vitro 1:20 in vivo	*
Anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos		
Anti-mouse 488	1:1000	Invitrogen
Anti-rabbit 488	1:1000	Invitrogen
Streptavidina	1:800	Invitrogen

TABLA II. Anticuerpos utilizados y sus respectivas diluciones. (*) Este anticuerpo es producido por un hibridoma del laboratorio de Joan Sayós.

Autofluorescencia en piel

La piel murina muestra una alta autofluorescencia que puede interferir en la interpretación de resultados de las inmunofluorescencias. Se realizó la inmunofluorescencia normalmente y posterior a la incubación con DAPI se trató a los tejidos con Sudan Black utilizado en una dilución de 1:100 en etanol 70% por 5 minutos.

Inyección de una proteína de fusión

Se utilizó una proteína de fusión que contiene la porción soluble del receptor CD300f unido a la porción Fc de una inmunoglobulina IgG2a⁴. La inyección de la misma se realizó 30 minutos antes de inyectar el ACF. No se anestesiaron a los ratones para este procedimiento dado que no es invasivo ni más doloroso que una inyección intraperitoneal.

Producción de lentivirus integrativos

Producción y purificación a gran escala de plásmido libre de endotoxinas para la producción de vectores lentivirales

Los tres plásmidos estructurales fueron adquiridos en Addgene: el primero contiene los genes que codifican para las proteínas estructurales y para las enzimas retrotranscriptasa e integrasa, el segundo contiene los genes que codifican para las proteínas de la envoltura viral y el último contiene los genes que codifican para Rev, necesario para la expresión de proteínas virales. Los plásmidos conteniendo los transgenes GFP y CD300f fueron proporcionados por Mg. Luciana Negro. Se transformaron bacterias con los distintos plásmidos mediante transformación química. Luego se purificó el ADN plasmídico utilizando un kit de purificación libre de endotoxinas (EndoFreePlasmid Maxi Kit #12362). Una vez obtenido el ADN plasmídico se procedió a transfectar células para la producción de los vectores.

Producción de LVs de tercera generación

La producción de LVs se realizó en células HEK293T. Las mismas fueron cultivadas en Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, High Glucose, -piruvato; Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS Gibco® #10106), penicilina a 100u/ml y estreptomycin a 100 mg/ml. Se incubaron a 37°C con un 5% de CO₂. Se sembraron 10 millones de células en 25 ml de medio completo, en placas de 15 cm y se cambió el medio a las 24 horas, 2 horas antes de la transfección con los plásmidos. Se preparó un mix de los ADN plasmídicos a utilizar y se realizó la transfección mediante fosfato de

calcio. A las 17 horas postranfección se cambia el medio (17 ml) y se agrega cafeína 4 mM para aumentar la producción de partículas lentivirales. Se recogió el sobrenadante de los siguientes dos días.

Purificación de LVs

Se centrifugó el medio recogido con los LVs a 2500 rpm por 10 minutos y se filtra el sobrenadante con filtros de 0,22 µm. Se centrifuga el medio filtrado a 50000 g por 2 horas y 30 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet. Por último se resuspende el pellet en 30 µl de DMEM y se centrifuga 10 minutos a 4000 rpm. Se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo; se agrega 0,6 µl de MgCl₂ cada 30 µl de sobrenadante y 2,5 µl de ADNasa. Se incuba 30 minutos a 37°C y se conserva en freezer a -80°C.

Titulación de LVs

Los LVs producidos fueron titulados mediante una relación entre células GFP positivas (o IREMI positivas) y DAPI positivas. En una placa de 24 pocillos se siembran 25000 células HeLa por pocillo con 500 µl de DMEM 10%FBS. Se incuban ON a 37°C. Se cambia el medio 30 minutos antes de la transfección; luego se siembran distintas diluciones de los LVs producidos (1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} y 1×10^{-5}) de ambos días de recolección (día 1 y día 2). Se realizan controles sin infectar y del sobrenadante sin diluir. Se deja en la estufa por 48 horas a 37°C. Quitamos el sobrenadante de los pocillos y se coloca 250 µl de PFA al 4% por 15 minutos. En el caso de los LVs con el transgén IREMI fue necesario realizar una inmunofluorescencia. Se lavaron las células con PBS, se bloqueó con solución de bloqueo (PBS + 10% FBS) por una hora a temperatura ambiente y se colocó el anticuerpo UPD2 producido en un hibridoma (1:100). Luego de los lavados correspondientes se incubó con un anticuerpo secundario αmouse conjugado a un fluoróforo (1:1000). Finalmente, y para ambos LVs producidos, realizamos lavados con PBS y se colocó DAPI a una dilución de 1:5000 por 10 minutos. Para calcular la relación entre células positivas y células totales se cuentan 5 campos por pocillo y se calcula:

$$\frac{\% \text{GFP positivas} \times \text{total de células sembradas} \times \text{dilución}}{100}$$

Inyección de LVs IREMI y GFP

Se realizaron dos experimentos de inyección de LVs integrativos. El primer experimento se realizó para verificar la transducción in vivo del transgén GFP una vez producidos los LVs. A su vez se realizó la inyección de LVs a dos tiempos diferentes: 3 días antes de realizar la inyección de ACF y 30 minutos después de realizar la inyección de ACF. En este caso solo se inyectaron LVs que expresaran GFP y el título de LVs inyectado en esta ocasión fue de $1,68 \times 10^8$, se inyectaron 20 µl intraplantares. Para inyectar a los ratones se los anestesió previamente con Xilacina a 8 mg/kg. Los animales fueron perfundidos 3 días después de la inyección de LVs. El segundo experimento se realizó para evaluar la sobreexpresión de IREMI en el modelo de dolor crónico por inyección de ACF. Se inyectaron 2 grupos con LVs, uno que expresara GFP y otro que expresara IREMI (además de un tercer grupo control inyectado con PBS). La inyección de LVs fue de 10 µl de un título de 10^7 para asegurar que el contenido no emerja de la pata una vez inyectado. Se diluyó a los LVs que expresan GFP para igualar los títulos de ambos LVs en el mismo buffer que se encontraban inmersos. Una vez transcurridos 14 días de la inyección con ACF se perfundieron ambos grupos.

Análisis estadístico

Todos los datos se muestran como la media ± el desvío estándar de la media (SEM). El análisis estadístico de los datos de comportamiento animal se determinó utilizando ANOVA dos factores con medidas repetidas seguido por análisis Tukey's post-hoc. Un valor de $p \leq 0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

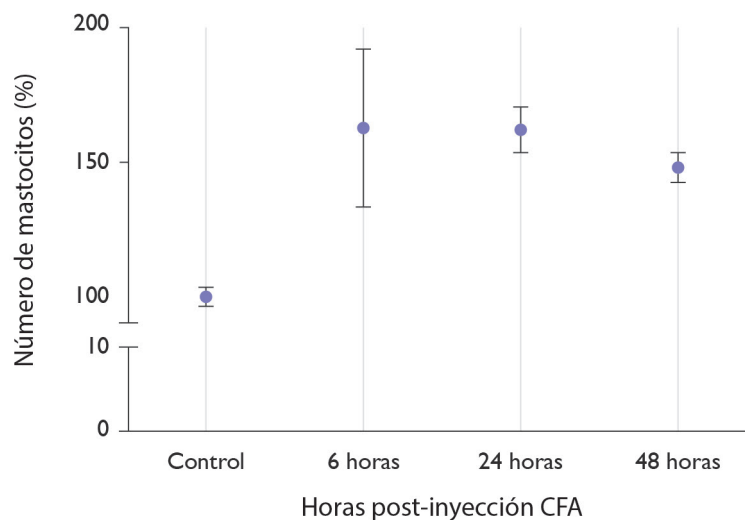
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descripción del modelo de dolor crónico inflamatorio

Población celular del modelo

Se disecó tejido plantar de ratón a las 6, 24 y 48 horas posteriores a la inyección con ACF para evaluar la población de mastocitos que se encuentra en distintos períodos del proceso inflamatorio. Las técnicas utilizadas para observar la población celular fueron la tinción de Nissl y la inmunofluorescencia. Mediante la primera se realizó el conteo de mastocitos utilizando un microscopio óptico. Se contaron los mastocitos en 3 zonas elegidas al azar del mismo corte de piel y se repitió el procedimiento en 3 cortes por cada animal. Se realizó un promedio de 2 animales por grupo.

Conteo de mastocitos en modelo de dolor inflamatorio



GRÁFICA I. Número de mastocitos por mm² en función de las horas posteriores a la inyección de ACF. Las muestras fueron teñidas con azul de toluidina y se contó los mastocitos utilizando un microscopio óptico. N=8 (2 por grupo). Los datos se expresan como promedio $\pm$ desvío standard.

Aún sin inflamación hay un número importante de mastocitos en piel que corresponden a los mastocitos residentes cuya función es proporcionar una respuesta rápida a agentes infecciosos y a mediar la producción de citoquinas y quemoquinas proinflamatorias²⁵.

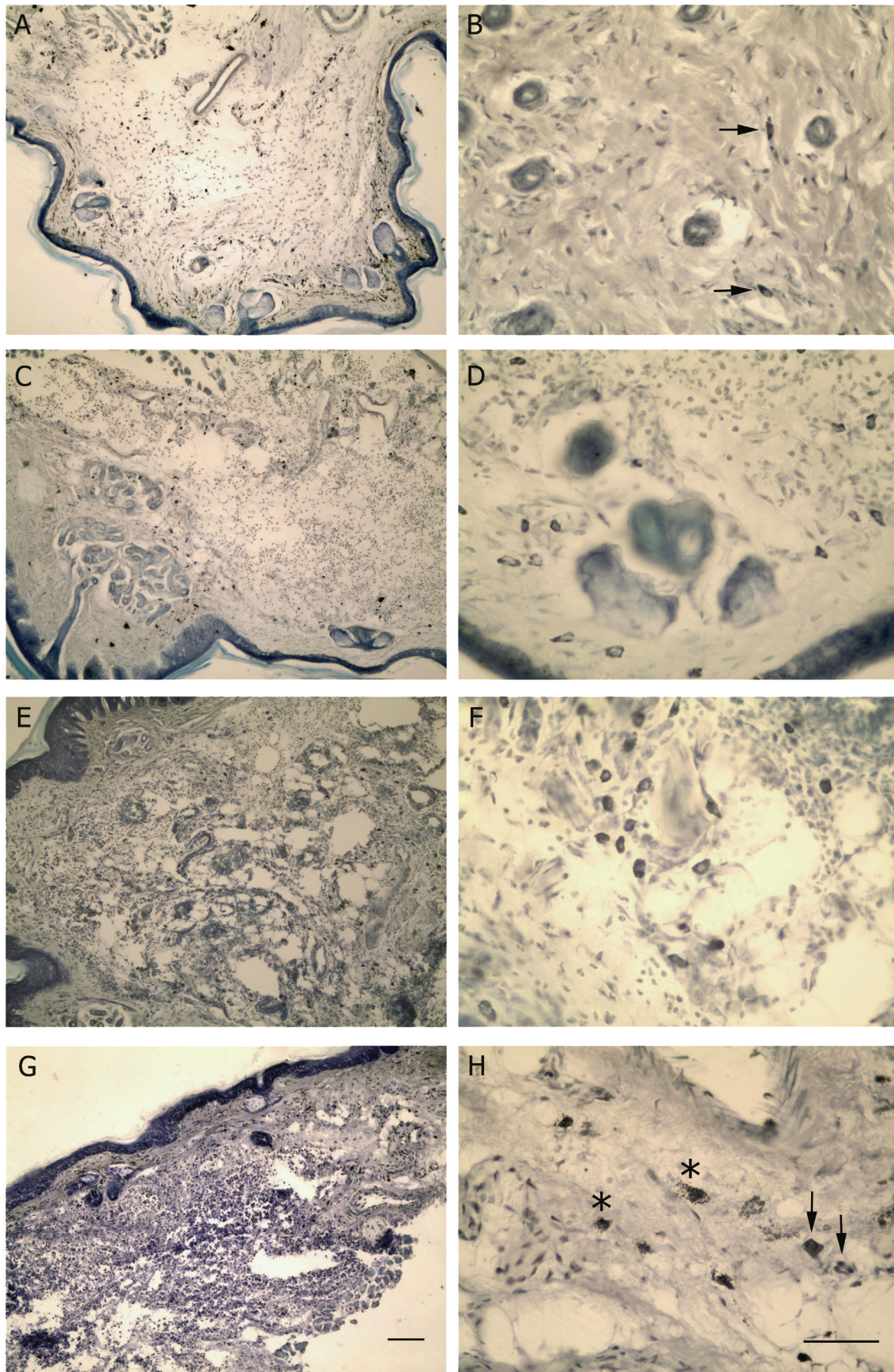
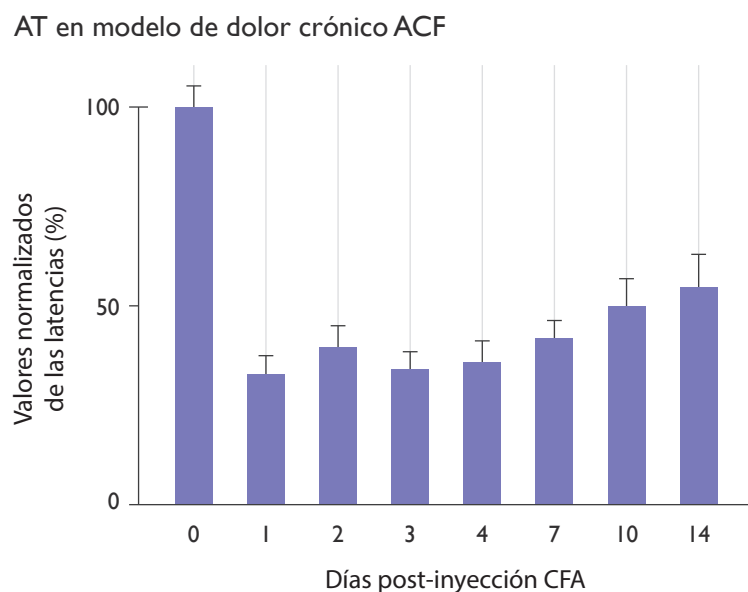


FIGURA 1. Secciones de tejido a diferentes momentos del proceso inflamatorio teñidos con azul de toluidina. A y B corresponden a piel sin inflamación, tanto en aumento 10x (A) como 40x (B). C y D piel 6 horas post inyección, 10x (C) y 40x (D). E y F piel 24 horas post inyección, 10x (E) y 40x (F). G y H piel 48 horas post inyección, 10x (G) y 40x (H). Las flechas indican mastocitos y los asteriscos indican mastocitos degranulados. Barra: 10X 100 micras, 40X 50 micras.

Conforme transcurren las horas después de la inyección de ACF se puede observar claramente cómo aumenta el número de mastocitos alcanzando un aumento de casi un 60% en las primeras 6 horas. A su vez se observó una población celular que no se encontraba presente en gran cantidad en tejido sin inflamación. Mediante tinción de Nissl se observó su tamaño considerablemente menor al de los mastocitos y mediante inmunofluorescencia (DAPI) se observó que en algunas de ellas sus núcleos eran lobulados (figura 3C). Células descritas bajo estas características, propias de la inflamación, son las células polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos).

Algesimetría térmica

Para comenzar a trabajar con el modelo de dolor crónico mediante inyección de ACF fue necesario familiarizarnos con el mismo. Se inyectó 20 µl de ACF en la pata trasera derecha de ratones C57BL6 y se evaluó la algesimetría térmica hasta el día 14 post inyección. Los animales fueron aclimatados previamente a la medida de las latencias por 1 hora. No sólo se midió las latencias de la pata inyectada, sino que además se midió la pata contralateral como un control (datos no mostrados). Se realizaron 4 medidas por pata y luego se realizó un promedio. Una vez finalizada la medida de las latencias se procesaron los datos: se promediaron las latencias basales previas a la inyección de ACF y se expresaron las latencias post inyección en función de las primeras.



GRÁFICA 2. Latencias de retirada de la pata trasera previas y posteriores a la inyección de ACF. Los valores fueron normalizados acorde al promedio de los basales obtenidos. Las latencias se expresan en función de los días posteriores a la inyección del ACF (0 a 14 días post inyección). N=2 por grupo.

La gráfica 2 muestra cómo disminuye la algesimetría térmica de los ratones a las 24 horas de la inyección en más de un 50%. El dolor se mantiene relativamente constante hasta el día 4 y a partir del día 7 se ve una leve mejoría. Sin embargo no se logran reestablecer los valores normales de algesimetría térmica. Lo observado se corresponde con descripciones anteriores del modelo. A las 6 horas de haberse inyectado el ACF se podía observar una inflamación en la pata inyectada; a su vez hasta el día 7 se pudo observar una diferencia clara en las latencias entre la pata inyectada y la pata control. Se pudo observar comportamientos típicos en modelos de dolor, si bien no son evaluados como parte del test de Hargreaves, tales como el poco apoyo del cuerpo sobre la pata inyectada y el exceso de acicalamiento en la misma. Estas características junto con las latencias nos permiten verificar la alodinia descrita en este y otros modelos de dolor.

Evaluación de la expresión de CD300f en inflamación

Con el objetivo de evaluar la expresión del inmunoreceptor CLM1 se utilizó la técnica de inmunofluorescencia; para la misma se contó con dos anticuerpos: Un monoclonal de rata anti-mouse y un policlonal de cabra anti-mouse (R&D; ver tabla 2).

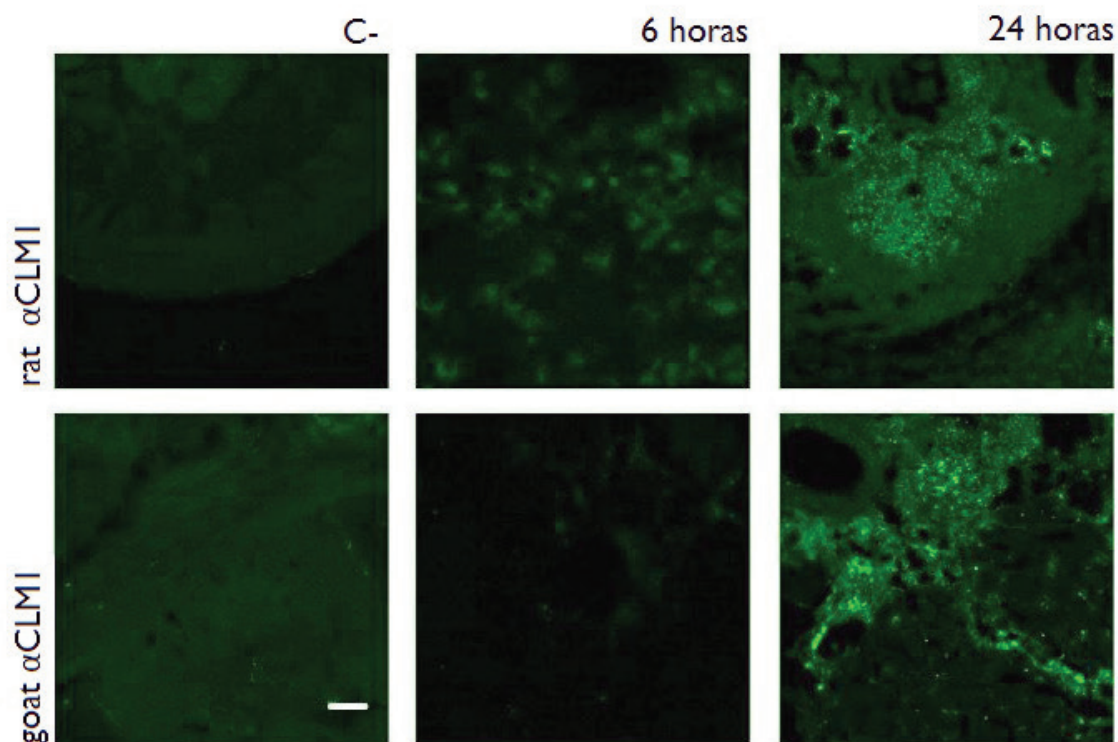


FIGURA 2. Inmunofluorescencia para el marcaje de CD300f (murino). Se utilizaron dos anticuerpos contra el marcaje de CD300f: un anticuerpo monoclonal de rata α mouse (fila A) y un anticuerpo policlonal de cabra α mouse (R&D) (fila B). Se observan el control negativo sin primario (C-), marcaje a las 6 horas post inyección de ACF y el marcaje a las 24 horas post inyección de ACF. Barra: 100 micras, Aumento: 10X.

Se realizó la técnica en piel correspondiente a inflamación a las 6 horas y a las 24 horas post inyección de ACF, como se observa en la figura 2. Tal como esperado, el marcaje a las 6 horas postinyección fue leve y no muy definido en comparación con el marcaje a 24 horas postinyección. Con ambos anticuerpos se observó un marcaje alrededor de vasos sanguíneos, lo cual podría coincidir con la presencia de mastocitos y macrófagos y con su función: favorecer la extravasación celular liberando los contenidos de sus gránulos. El anticuerpo de cabra mostró un marcaje más definido alrededor de las células, en comparación con el anticuerpo de rata lo cual puede explicarse por ser un anticuerpo policlonal y reconocer más epítopes que el anticuerpo monoclonal.

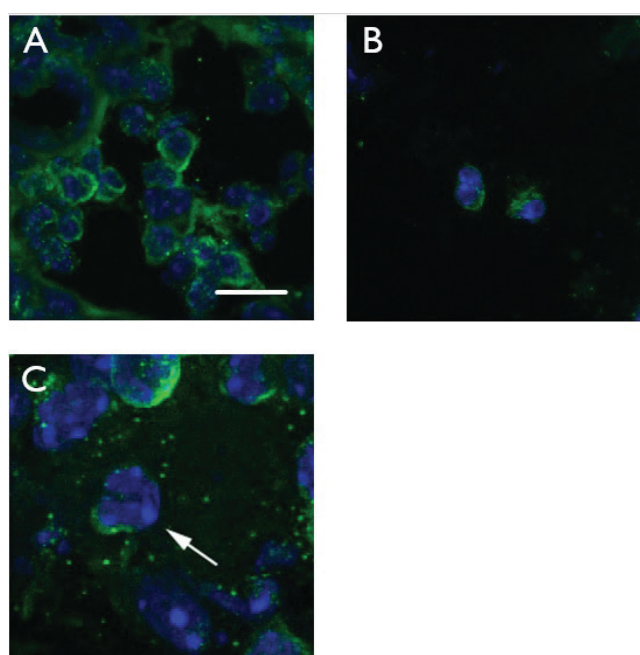


FIGURA 3. Maraje de CLMI con dos anticuerpos diferentes. A: anticuerpo de cabra anti mouse. B: anticuerpo de rata anti mouse. C: Maraje con anticuerpo de cabra anti mouse. La flecha indica una célula polimorfonuclear con marcaje. Aumento A y B: 63X; Barra: 25 μ m. Aumento C: 63X + zoom 1,6.

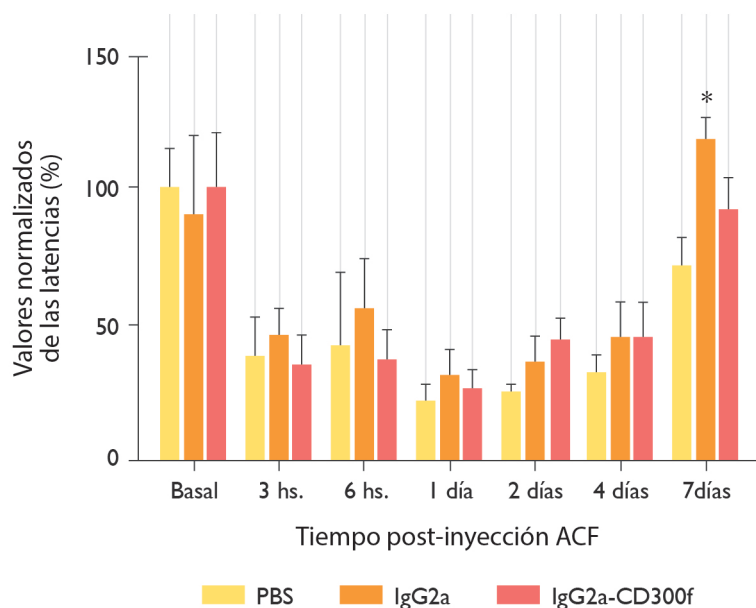
Efecto de la modulación del inmunoreceptor CD300f en un modelo de dolor crónico inflamatorio

Bloqueo de la interacción CD300f-ligando

Observamos el efecto de neutralizar el ligando del CD300f mediante una proteína de fusión soluble (CD300f-IgG2a) la cual se inyecta 30 minutos antes de la inyección con ACF. Para este experimento se utilizaron 3 grupos de ratones C57LB: se utilizaron dos grupos control, uno con PBS y otro con IgG2a (control de isotipo) y el último grupo se le inyectó la proteína de fusión. Se midió la algesimetría térmica de los ratones a las 3 y 6 horas y a los días 1, 2, 3, 4 y 7 post-inyección. A los 15 días se perfundieron los ratones y se extrajo la piel ipsi y contralateral.

A las 6 horas ya se observa hiperalgesia térmica que perdura hasta los 7 días correspondiéndose con la descripción del modelo ya realizada. En cuanto al tratamiento realizado, esperábamos que el bloqueo de la interacción entre el CD300f y su ligando aumentara la hiperalgesia debido a la falta de ligando de CD300f, lo que le imposibilitaría cumplir con su función moduladora. Al contrario de lo esperado, no observamos cambios significativos en el grado de hiperalgesia térmica. Hay que tener en cuenta que se realizó una sola inyección de la proteína de fusión, por lo que puede no haber sido suficiente para bloquear todo el ligando del receptor. Si bien no se conoce con certeza el ligando de CD300f, se ha postulado que las ceramidas interactúan con el mismo. Concordando con esta idea, se ha descrito que ante un evento inflamatorio la concentración de ceramidas en la zona de inflamación aumenta significativamente. Para seguir trabajando en esta línea se utilizará una cepa de ratones Knock Out para el inmunoreceptor CLMI de ratón, ortólogo del CD300f humano.

AT en un tratamiento con proteína de fusión



GRÁFICA 3. Algesimetría térmica con tratamiento de una proteína de fusión que bloquea la interacción entre CD300f y su ligando. Se observan dos grupos control: inyección con PBS e inyección con IgG2a. El grupo inyectado con la proteína de fusión es IgG2a-CD300f. N=4 por grupo. * p<0,05 vs PBS

Por otro lado hemos observado que el control isotípico con IgG2a produjo una analgesia significativa en el día 7 postinyección de ACF. En varias investigaciones se ha observado el efecto inmunomodulador que producen un pool de inmunoglobulinas de tipo G (IgG) en distintas enfermedades, por lo que este efecto podría ser consistente con la bibliografía. Se ha observado que una inyección de un pool de IgG puede inducir la apoptosis e inhibir la activación en leucocitos, neutralizar componentes del sistema del complemento, reducir la infiltración de neutrófilos mediante la reducción de la expresión de la enzima MMP-9, reducir los niveles de citoquinas y quemoquinas proinflamatorias y facilitar la recuperación de los tejidos^{57,58}. Se conoce que el isotipo IgG2a murino, homólogo al IgG1 humano, participa en las funciones de neutralización, opsonización, sensibilización a la muerte por células NK, sensibilización de mastocitos y activación del sistema del complemento contribuyendo a la disminución de la inflamación²⁶.

Sobreexpresión de CD300f

Para continuar con la evaluación de la modulación del inmunoreceptor se produjeron vectores lentivirales con el objetivo de sobreexpresar IREM I in vivo¹. Simultáneamente se produjeron LVs que expresaran GFP para ser utilizados como control.

Producción de LVs

Se utilizó el protocolo puesto a punto por nuestro laboratorio⁵⁹. Para la producción se transfectó células Hek 293T con los plásmidos que contienen los genes que codifican para las proteínas estructurales y para las enzimas retrotranscriptasa e integrasa, otro plásmido que contiene los genes que codifican para las proteínas de la envoltura viral y un último plásmido que contiene los genes que codifican para Rev, necesario para la expresión de proteínas virales. La transfección se realizó mediante el método de fosfato de calcio y 17 horas post transfección se cambió el medio. Luego se recogió el sobrenadante de los dos días siguientes. Los LVs fueron purificados y titulados. La producción de ambos LVs se observó mediante microscopía de epifluorescencia durante la titulación, siendo necesario realizar una inmunofluorescencia para los LVs IREM I marcando la proteína con un anticuerpo específico. Se verificó que el transgén IREM I produjera una proteína viable realizando una transfección con el plásmido y realizando una inmunofluorescencia; se utilizó como control un plásmido el cual se conocía su correcto funcionamiento.

Puesta a punto inmunofluorescencia con el anticuerpo UPD2

Fue necesaria la puesta a punto de la inmunofluorescencia para el marcaje de CD300f humano expresado por las células transfectadas con los LVs. Para esto se realizó la transfección de células HeLa mediante el método de fosfato de calcio con el plásmido del transgén que contiene el vector viral (IREM I) y un plásmido control que codifica para la misma proteína (D5). Las células fueron fijadas con PFA 4% y posterior a los lavado con PBS, se bloqueó con solución de bloqueo (PBS + 10%FBS). Para detectar ambas proteínas se utilizó un anticuerpo UPD2 en concentraciones de 1:100 para D5 y 1:10 para IREM I. Se incubó con el mismo ON a 4°C. Posteriormente se colocó un anticuerpo secundario anti-mouse 488 a una concentración de 1:1000 y se incubó con DAPI por 5 minutos.

I. Los protocolos para la producción, purificación y titulación se muestran en 3.6, Materiales y métodos – Producción de LVs.

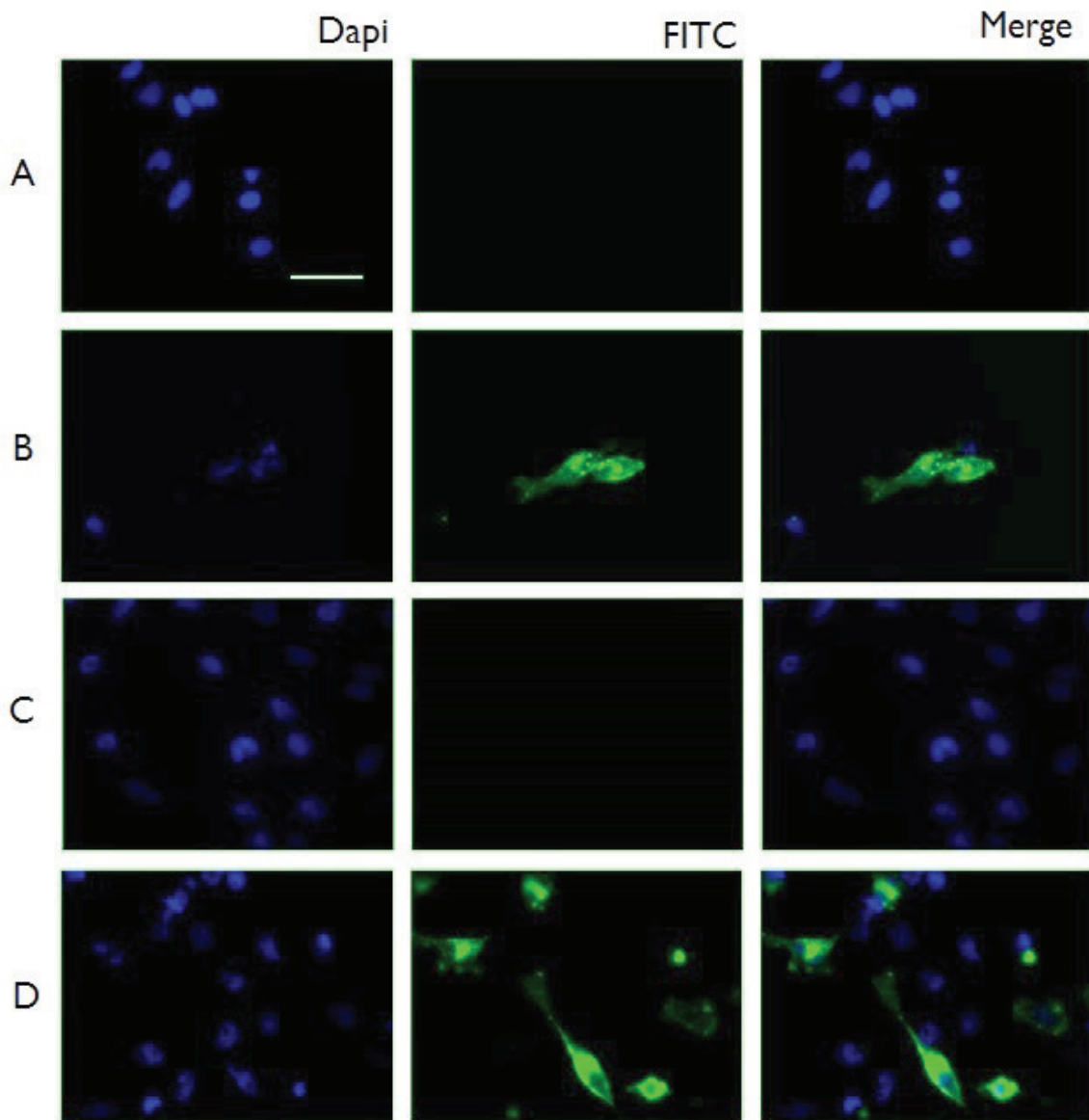


FIGURA 4. Transfección de células HeLa mediante el método de fosfato de calcio. En la fila B se observa la tranfección de las células con el plásmido D5, un plásmido control del cual conocemos su correcto funcionamiento. En la fila D se observa la transfección con el plásmido utilizado como transgén en los vectores lentivirales. Ambos plásmidos expresan la misma proteína. En las filas A y C se observan los controles de las células sin tranfectar para ambos plásmidos. El anticuerpo primario utilizado es UPD2 y el secundario es un anticuerpo α mouse 488. Barra: 20 micras; Aumento: 40X.

Titulación de los LVs

Para la titulación de los LVs producidos se plaquearon células HeLa y se transfectó las mismas con diluciones seriadas de los LVs por duplicado, de ambos días de harvest o cosecha. En el caso de los LVs para IREMI se realizó una inmunofluorescencia, mientras que para los LVs GFP se observaron directamente mediante microscopía de epifluorescencia. Para titularlos se realizó una relación entre células GFP positivas (o IREMI positivas) y DAPI positivas. Para titular es necesario elegir la dilución en la cual se transfectan desde un 5 a un 10% de las células para no subestimar las partículas virales, ya que si hay más células transfectadas puede haberse dado una infección en la célula por más de una partícula viral. Por lo tanto se calculó la dilución en la cual las células transfectadas no fueran más del 10% del total.

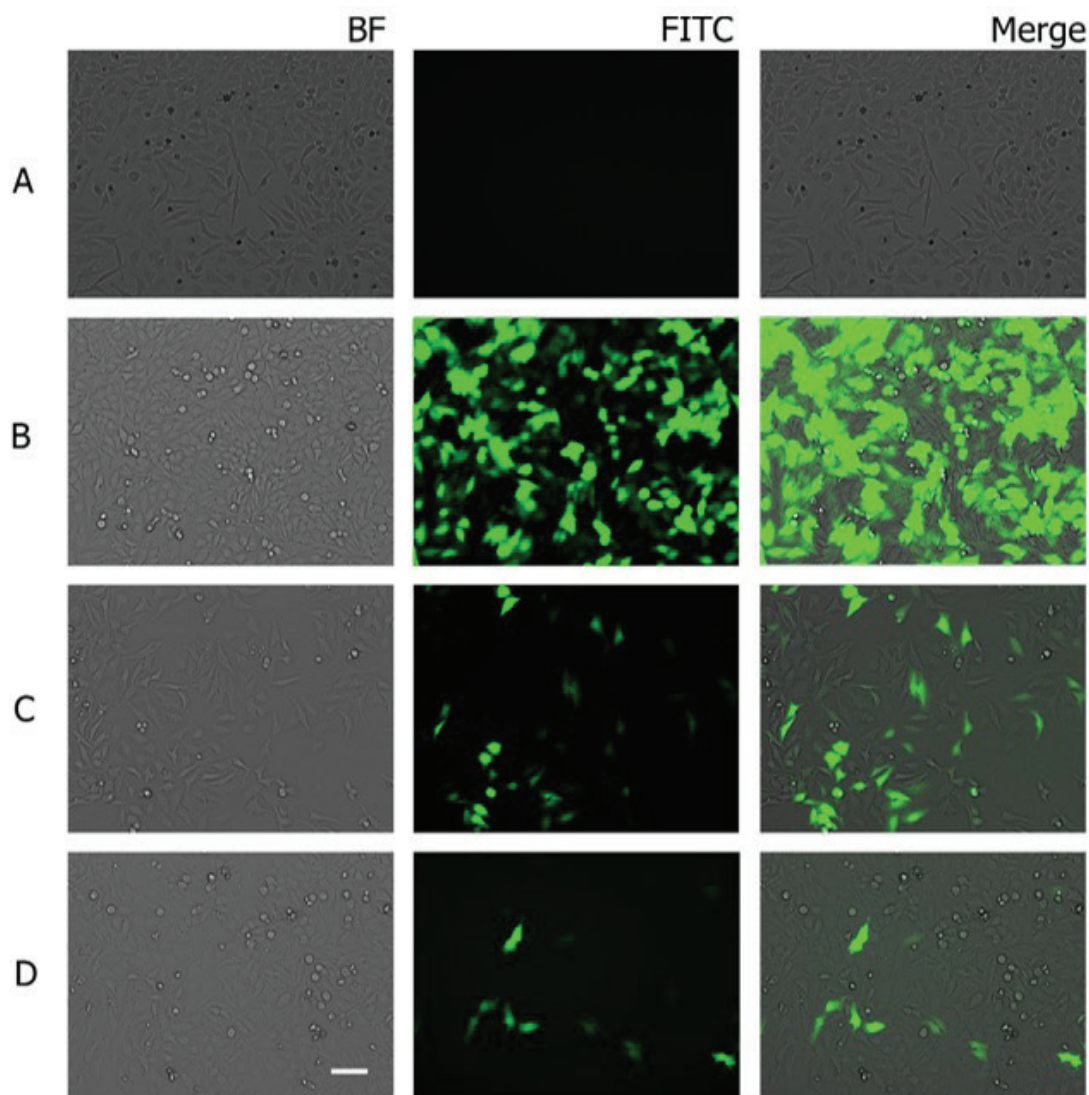


FIGURA 5. Titulación de LVs GFP del día 1 de harvest. Se analizó la concentración de LVs producidos utilizando diluciones seriadas de la fracción purificada de los LVs. Las diluciones realizadas fueron 1:1.000 (-3), 1:10.000 (-4) y 1:100.000 (-5). Se muestran las células totales en BF (contraste de fase) (columna A), las células GFP positivas con FITC (columna B) y el merge entre ambas (columna c). También se muestra el control sin transfectar. Barra: 100 micras; Aumento: 10x.

Se contó 5 campos por pozo (10 campos por dilución tomando en cuenta el duplicado) y se calculó:

$$\frac{\% \text{GFP positivas} \times \text{total de células sembradas} \times \text{dilución}}{100}$$

En la figura 5 se observa la titulación del primer día de harvest de los LVs GFP. En la dilución -5 se calculó un porcentaje de células fluorescentes de 6,74%. Utilizando este dato se calculó un título de $1,68 \times 10^8$ UT/ml.

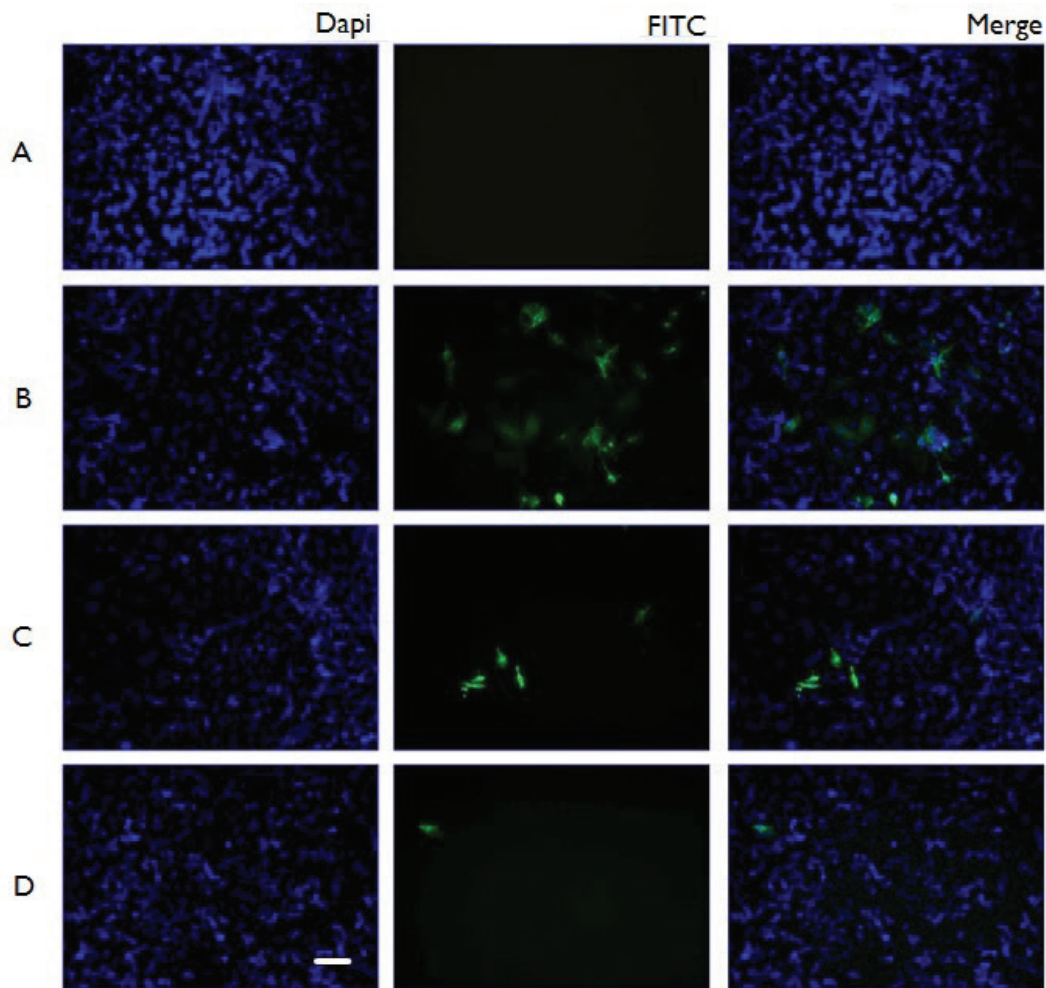


FIGURA 6. Titulación de LVs IREMI del día 1 de harvest. Se analizó la concentración de LVs producidos utilizando diluciones seriadas de la fracción purificada de los LVs. Las diluciones realizadas fueron 1:1.000 (B), 1:10.000 (C) y 1:100.000 (D). Se muestran las células totales con DAPI, las células UPD2 positivas con FITC y el merge entre ambas. También se muestra el control sin transfectar (A). Barra: 100 micras; Aumento: 10X.

Cuando se tituló los LVs para GFP se observó que al día 1 postransfección había fluorescencia lo cual no es consistente con lo descrito en la bibliografía. La expresión de las proteínas inducida por transfección con LVs se ha reportado desde el día 3 postransfección. Se atribuyó esto al posible arrastre de proteínas o ARNm en las partículas lentivirales formadas.

En la figura 6 se observa la titulación del primer día de harvest de los LVs IREMI. En la dilución -5 se calculó un porcentaje de células fluorescentes de 2%. Por lo que el título de los LVs fue de $5,32 \times 10^7$ UT/ml.

Se logró producir partículas lentivirales portando los transgenes GFP y IREMI, estos últimos por primera vez obteniendo un título importante de los mismos.

Transducción in vivo

Para verificar que los LVs pueden infectar correctamente células in vivo se realizó una inyección de LVs GFP en ratones a dos tiempos diferentes: 3 días antes de realizar la inyección de ACF y 3 horas después de realizar la inyección de ACF. El título de LVs inyectado en esta ocasión fue de $1,68 \times 10^8$, se inyectaron 20 μ l intraplantares. Para inyectar a los ratones se los anestesió previamente con Xilacina a 8 mg/kg.

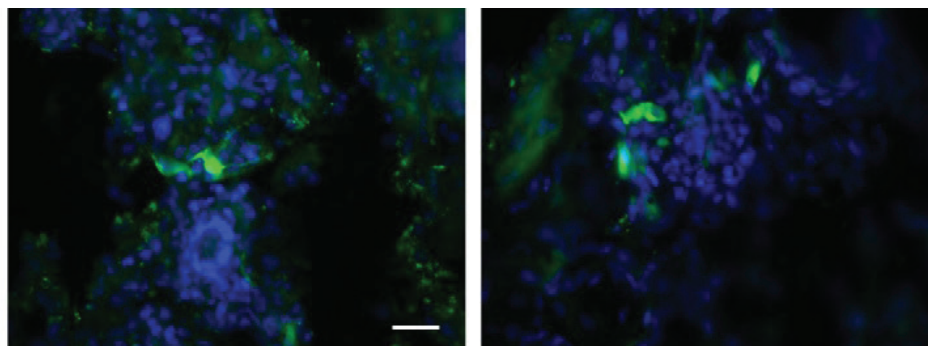


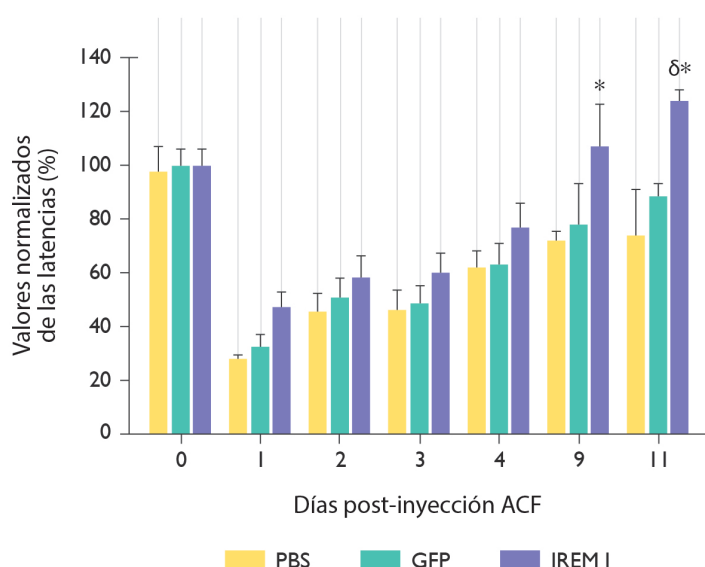
FIGURA 7. Expresión de GFP in vivo tras la inyección de LVs con el transgén GFP. Barra: 50 micras; Aumento: 20X.

Inyectando los lentivectores a distintos tiempos se quiso evaluar la transducción de los distintos tipos celulares: células residentes 3 días antes de la inyección de ACF y células infiltradas 3 horas después de la inyección de ACF. Se observó que en el grupo inyectado 3 días antes de la inyección de ACF tenía células transducidas, aunque una cantidad significativamente menor de células. Al esperar 3 horas se da tiempo para que aumente la infiltración de células por lo que aumenta el número de células transducidas. Pensamos que también afecta el hecho de que el LV es integrativo, por lo que las células infiltradas pueden sufrir proliferación y aumentar la cantidad de células expresando el transgén. Además de esto consideramos que la aplicación clínica de inyectar los LVs posterior a la producción de la inflamación es más relevante que la inyección anterior. Por estas razones se consideró que inyecciones de LVs deberían ser posteriores a la inflamación. Como la transducción efectiva se puede observar a partir del tercer día postinfección, se esperó tres días para sacrificar a los ratones. Posteriormente se procesaron los tejidos para inmunohistoquímica contra GFP. Además del título se pudo observar la efectividad de infección de los LVs y la efectividad de traducción de las proteínas codificadas por el transgén.

Inyección de LVs en modelo de dolor inflamatorio

Continuando con la evaluación de la modulación del inmunoreceptor se procedió a realizar pruebas in vivo. Las mismas consistieron en inyectar animales con ACF y pasados 3 horas de la inyección se les inyectó de forma local (intraplantar) LVs (o PBS). Se realizaron 3 tratamientos: un grupo inyectado con PBS, un grupo inyectado con LVs GFP y un grupo inyectado con LVs IREMI. La inyección con LVs se realizó extremando las medidas de bioseguridad para los operadores. Para evaluar el efecto del tratamiento se realizó algiesimetría térmica en los ratones con los distintos tratamientos e inmunofluorescencia para confirmar la expresión de los transgenes. La algiesimetría térmica se midió los días 1, 2, 3, 4, 9 y 11 post inyección.

AT en tratamiento con LVs IREM I



GRÁFICA 4. Algesimetría térmica en ratones con distintos tratamientos post inyección de ACF. Los valores fueron normalizados acorde al promedio de los basales de cada grupo. PBS: grupo control inyectado con PBS posterior a la inyección. GFP: Grupo control inyectado con LVs con el transgén GFP posterior a la inyección con ACF. IREM1: grupo inyectado con LVs con el transgén IREM1 posterior a la inyección con ACF. (N=4 por grupo) * p<0,05 vs PBS δ: p<0,05 vs GFP.

En la gráfica 4 se muestra la comparación entre los distintos tratamientos aplicados a los ratones. En los tres grupos se observó una disminución en las latencias medidas posterior a la inyección con ACF lo cual concuerda con la caracterización del modelo realizada inicialmente. A su vez, podemos observar que a medida que transcurren los días post inyección de ACF (y de tratamiento) la recuperación del grupo inyectado con el lentivector portando el transgén de IREM1 es superior al resto de los grupos.

En los días 9 y 11 post inyección se pueden observar diferencias significativas en cuanto a los valores de algiesimetría térmica, con respecto al grupo PBS (día 9 y 11) y con respecto al grupo GFP (día 11). Se puede observar que, al día 11, mientras que los grupos PBS y GFP no se han recuperado en su totalidad el grupo IREM1 ya ha restablecido sus valores basales de algiesimetría térmica. El grupo inyectado con el lentivector portando el transgén GFP mantiene sus valores de algiesimetría térmica similares a los del grupo control PBS.

Si bien el transgén comienza a expresarse a partir del día 3 postinyección se ha visto una leve mejoría (no significativa) desde el día 1. Cuando se realizó la transfección con los LVs in vitro en células HeLa se observó expresión del transgén a partir del día 1. Atribuimos esto al posible arrastre de proteína o ARNm en las partículas lentivirales. Esto es consistente con los resultados de aumento de las latencias de retirada desde el día 1.

La nocicepción puede ser alterada en distintos puntos del procesamiento de la misma, como ya se ha detallado anteriormente. El receptor CD300f ha sido descrito como un activador e inhibidor celular en la línea mieloide. Tras la activación de determinadas células existen mecanismos efectores de las mismas, uno de los cuales es la producción de citoquinas y quemoquinas proinflamatorias. Una posible explicación para la disminución de la hiperalgesia tras la sobreexpresión del CD300f es que el receptor estuviese actuando como inhibidor de la respuesta celular. De esta forma prevendría la degranulación de mastocitos o activación de células del sistema inmune. La producción y secreción de citoquinas y quemoquinas proinflamatorias disminuiría así como la cascada inflamatoria que generan. Las citoquinas y quimioquinas son las encargadas de la inflamación del tejido y de la sensibilización de los nociceptores, por lo que al disminuir la concentración de las mismas, disminuirían también sus efectos. Al evitar la sensibilización de los nociceptores la médula espinal no recibiría tantas señales aferentes, por lo que sería más difícil su sensibilización.

Por otro lado, se ha observado que el CD300f tiene la capacidad de unirse a células apoptóticas y células activadas mediante su unión a la fosfatidilserina (PS). La exposición de la PS en la capa exterior de la membrana plasmática celular puede actuar como una señal de fagocitación de la célula. Para restablecer la homeostasis de un tejido es necesario que las células muertas presentes en el tejido sean fagocitadas. Por lo que la expresión aumentada de CD300f puede contribuir a la fagocitosis de células muertas o activadas, a la restitución del tejido y por lo tanto a una correcta resolución de la inflamación. En este aspecto el inmunoreceptor podría actuar como un activador en células cuya función efectora es la fagocitosis (macrófagos, neutrófilos y células dendríticas).

Otro aspecto que puede estar influyendo en la disminución del dolor es el efecto regulador negativo que tiene el CD300f en la quimiotaxis de eosinófilos. En ratones KO para CLM1 se observó la exacerbación de respuestas alérgicas incluyendo anafilaxis, inflamación de las vías respiratorias y dermatitis atópica, así como un nivel basal de eosinófilos aumentado. Se ha observado que en un grupo con rinitis alérgica el inmunoreceptor tiene una expresión elevada en comparación con un grupo sano. Debido a esto se ha propuesto que CLM1 es quien regula los niveles basales de eosinófilos⁶⁰. Los eosinófilos tienen funciones importantes como la regulación en reacciones de hipersensibilidad (alergias) y defensa del organismo contra microorganismos no fagocitables. Cuando se activan los eosinófilos secretan un rango de proteínas altamente tóxicas, además de radicales libres, que si bien son efectivos en la eliminación de bacterias y parásitos, también son responsables de daño tisular. La sobreexpresión del inmunoreceptor puede actuar en la disminución del dolor al prevenir la quimiotaxis de eosinófilos y la liberación de dichas sustancias.

Verificación de la transducción mediante inmunohistoquímica

El día 14 post inyección se sacrificaron los ratones y se diseccionó la piel ipsilateral, se conservó en PFA 4% por 4 horas y se trató con una solución crioprotectora. El tejido fue incluido en TissueTek, congelado y cortado en secciones utilizando un criostato. Las secciones fueron colocadas en portaobjetos y se realizó inmunohistoquímica en los grupos de ratones inyectados con LVs GFP e IREM1 para verificar la transducción de las células siguiendo los protocolos ya especificados.

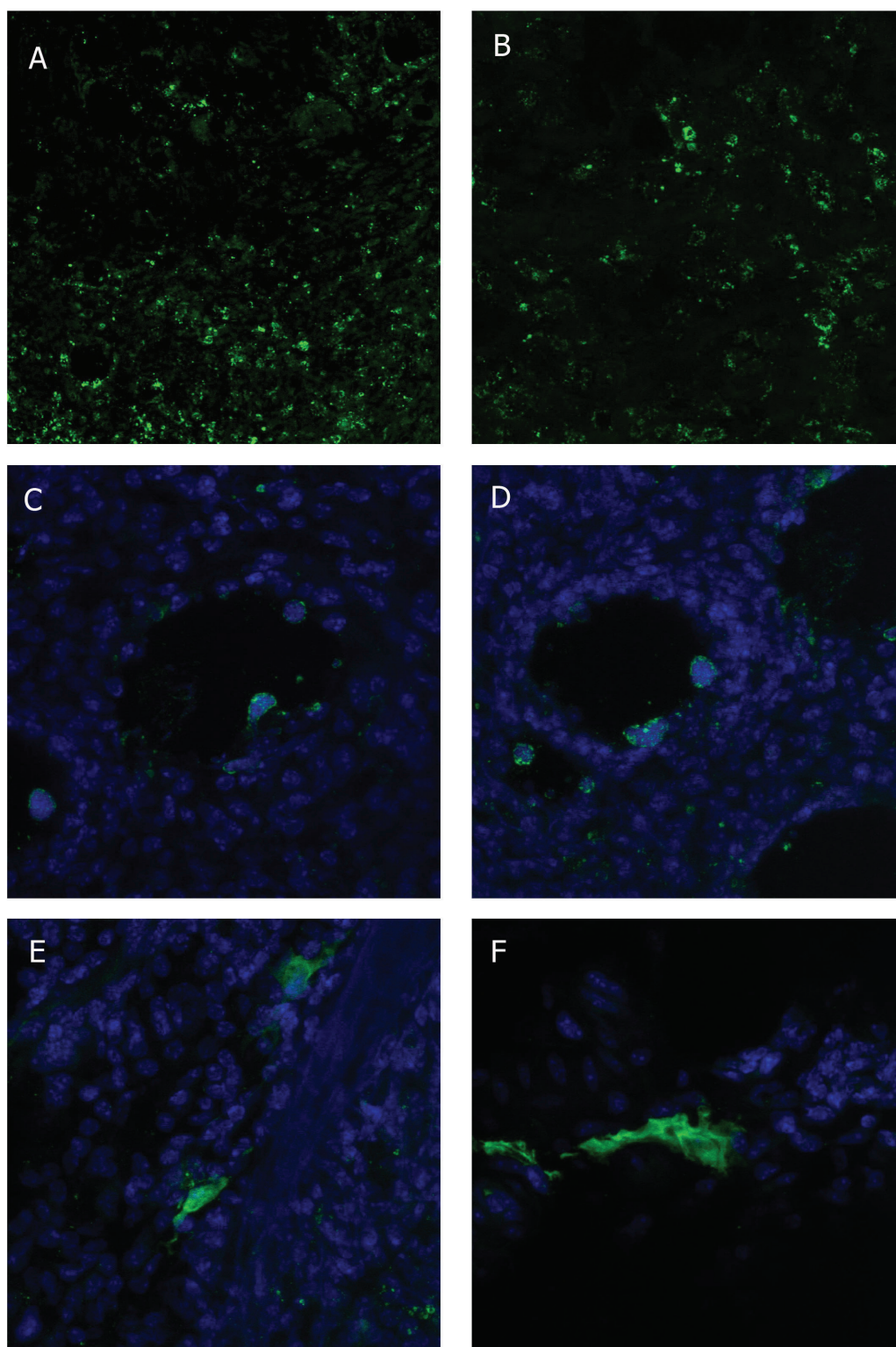


FIGURA 8. Inmunohistoquímica contra GFP tras la inyección de LVs con transgén GFP observada mediante microscopía confocal. En A y B se observa el patrón de marcaje punteado. En C y D se observan células en la capa interior de los vasos sanguíneos. Barra C-F: 25 micras. Aumento: A y B 20x; C-F 63X.

En cuanto al grupo inyectado con LVs GFP se observó un marcaje definido que se encuentra en varios tipos celulares. Las células que mostraron marcaje tienen morfologías, tamaños y ubicaciones variados mostrando la versatilidad de infección del LV. Como era de esperar, la mayoría de las células transducidas se encontraban en la zona de edema. En la figura 8 se observan distintos tipos celulares transducidos. De acuerdo a la morfología y tamaño de las células pensamos que se transdujeron células de Langerhans y varios polimorfonucleares. En 8.C y 8.D podemos observar células que se encuentran en la capa epitelial de los vasos sanguíneos. Debido a su morfología y posición en la membrana, consideramos que estas células no son epiteliales, sino que son células del sistema inmune que se encuentran extravasando hacia los vasos. Sería importante realizar el marcaje para GFP junto con otros marcadores celulares para identificar los tipos celulares transducidos.

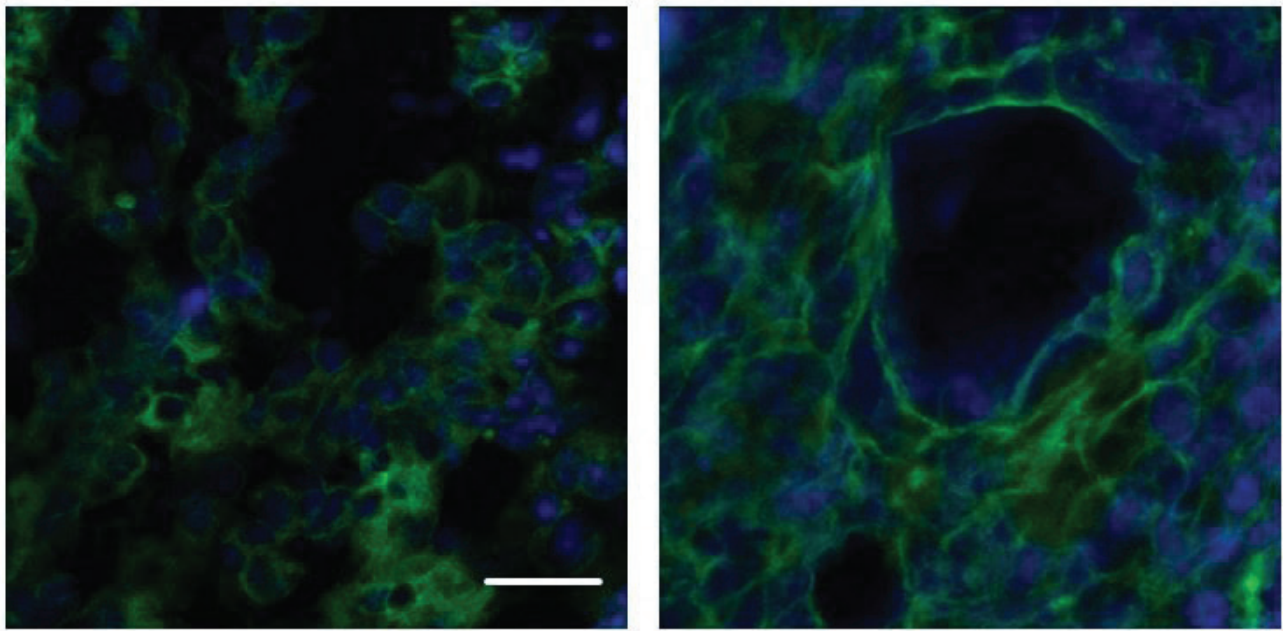


FIGURA 9. Inmunohistoquímica para detectar CLMI utilizando un anticuerpo primario UPD2. Barra: 25 micras. Aumento: 63x.

En cuanto a CLMI pudimos observar un marcaje en células individuales que se localiza principalmente en la zona de edema. En ese sitio se encuentran las células que han extravasado al tejido debido a la inflamación. Debido a que el marcaje se observó en muchas zonas del tejido y que el mismo no estaba bien definido, creemos que la expresión de CLMI debe ser verificada por otros métodos tales como RT-PCR.

CONCLUSIÓN GENERAL

Últimamente se ha manifestado especial interés en las células del sistema inmunitario y su rol en el dolor crónico. Se han descripto funciones moduladoras de las mismas debido a los receptores que presentan y su acción en las funciones efectoras celulares. Este trabajo muestra cómo la modulación del inmunoreceptor CD300f tiene efectos en la nocicepción en un modelo de dolor crónico inflamatorio. Se evaluó la expresión de CD300f en distintos tiempos de la inflamación, así como la población de mastocitos presente. La terapia génica se ha considerado cada vez más como una estrategia de tratamiento ante el dolor crónico. Existen ensayos clínicos fase I (humanos), en los que se utilizan vectores virales que muestran su eficacia en el tratamiento de dolor crónico. En este trabajo se ha logrado producir vectores lentivirales que portan los transgenes GFP y CD300f, siendo la primera vez que se produce este último. Ambos mostraron una infección efectiva tanto in vitro como in vivo. Los LVs se utilizaron para sobreexpresar el inmunoreceptor CD300f en el modelo de dolor crónico inflamatorio y se evaluó la algiesimetría térmica de los ratones para observar los cambios en la nocicepción. Los resultados muestran que la sobreexpresión del CD300f genera una disminución de las latencias de retirada medidas, lo que lo posiciona como una posible terapia prometedora en el tratamiento para esta afección. A su vez se ha observado que la inyección de LVs que expresan GFP in vivo no produce cambios en las latencias medidas con respecto a la inyección de PBS. Esto muestra que los cambios en las latencias son producidos exclusivamente por la expresión del inmunoreceptor y no por efecto del vector.

Por lo tanto, podemos concluir que el inmunoreceptor CD300f es un modulador importante en la sensibilidad nociceptiva y que su sobreexpresión generada por vectores lentivirales puede ser considerado como una estrategia prometedora para el tratamiento de dolor crónico.

PERSPECTIVAS

Para continuar estudiando al inmunoreceptor se estudiarán los mecanismos que puedan estar implicados en la modulación de la nocicepción. Se estudiará la variación en las citoquinas, quimioquinas y otros factores presentes en la inflamación tras la sobreexpresión del CD300f en la cepa C5BL6. A su vez se estudiarán las variaciones en la reactividad glial en el modelo.

Para seguir estudiando la modulación del CD300f en el modelo de dolor crónico se cuenta con animales Knockout para el inmunoreceptor. Hasta el momento se ha evaluado la algiesimetría térmica a nivel basal no observándose diferencias entre los ratones CLMI-KO y los wild type (datos no mostrados). Se evaluará la algiesimetría térmica en estos animales en el modelo de dolor crónico inflamatorio. A su vez se caracterizará la población mastocitaria y de macrófagos. Se realizará la inyección de LVs para sobreexpresar el CD300f y se evaluará la variación de las latencias. A su vez, para evaluar cómo el receptor modula la función celular se estudiará la presencia de distintos factores mediadores de la inflamación tanto sobreexpresando el inmunoreceptor como en los animales knockout.

BIBLIOGRAFÍA

1. Xu, Q. & Yaksh, T.A brief comparison of the pathophysiology of inflammatory versus neuropathic pain. *Curr. Opin. Anesthesiol.* 24, 400–407 (2011).
2. Izawa, K. et al. The receptor LMIR3 negatively regulates mast cell activation and allergic responses by binding to extracellular ceramide. *Immunity* 37, 827–39 (2012).
3. Xi, H. et al. Negative regulation of autoimmune demyelination by the inhibitory receptor CLM-I. *Exp. Med.* (2010).
4. Peluffo, H. et al. Overexpression of the immunoreceptor CD300f has a neuroprotective role in a model of acute brain injury. *Brain Pathol.* 22, 318–28 (2012).
5. Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C. & Joris, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* (1988).
6. Kumar Bali, K. & Kuner, R. Noncoding ARNs: key molecules in understanding and treating pain. *Cell Press* 959, (2014).
7. Goins, W., Cohen, J. & Glorioso, J. Gene therapy for the treatment of chronic peripheral nervous system pain. *Neurobiol. Dis.* 48, 255–270 (2012).
8. Dubin, A. & Patapoutian, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J. Clin. Invest.* 120, 3760–3772 (2010).
9. Carr, F. B. & Zachariou, V. Nociception and pain: lessons from optogenetics. *Front. Behav. Neurosci.* 8, 69 (2014).
10. Raja, S., Meyer, R. & Campbell, J. Peripheral mechanisms of somatic pain. *Anesthesiology* (1988). at <http://journals.lww.com/anesthesiology/Abstract/1988/04000/Peripheral_Mechanisms_of_Somatic_Pain.16.aspx>
11. Zigmond, M., Bloom, F., Landis, S., Roberts, J. & Squire, L. *Fundamental Neuroscience*. (Academic Press, 1999).
12. Wang, L. X. & Wang, Z. J. Animal and cellular models of chronic pain. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 949–65 (2003).
13. Li, K., Tan, Y., Light, A. & Fu, K. Different peripheral tissue injury induces differential phenotypic changes of spinal activated microglia. *Clin. ...* 2013, (2013).
14. Campana, W. Schwann cells: activated peripheral glia and their role in neuropathic pain. *Brain. Behav. Immun.* 21, 522–527 (2007).
15. Lin, T., Li, K., Zhang, F. & Zhang, Z. Dissociation of spinal microglia morphological activation and peripheral inflammation in inflammatory pain models. *J. ...* 192, 40–48 (2007).
16. Cleary, D. & Heinricher, M. Adaptations in responsiveness of brainstem pain-modulating neurons in acute compared with chronic inflammation. *Pain* 154, 845–855 (2012).
17. Ellis, A. & Bennett, D. L. H. Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. *Br. J. Anaesth.* 111, 26–37 (2013).
18. Marchand, F., Perretti, M. & McMahon, S. B. Role of the immune system in chronic pain. 6, 521–532 (2005).
19. Karp, C. et al. Defective lipoxin-mediated anti-inflammatory activity in the cystic fibrosis airway. *Nat Immunol* 5, 388–392 (2004).
20. Kohli, P. & Levy, B. D. Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 158, 960–71 (2009).
21. Levy, B. D., Kohli, P. & Serhan, C. Protectin D1 Is Generated in Asthma and Dampens Airway Inflammation and Hyperresponsiveness. *J. Immunol.* 178, 496–502 (2007).
22. Serhan, C., Chiang, N. & Van Dyke, T. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 349–361 (2008).
23. Billiau, A. & Matthys, P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J. Leukoc. Biol.* 70, 849–860 (2001).
24. Eliav, E., Herzberg, U., Ruda, M. & Bennet, G. Neuropathic pain from an experimental neuritis of the rat sciatic nerve. *Pain* (1999).
25. Tay, S., Roediger, B. & Weninger, W. The skin- resident immune network. *Curr. Dermatol. Rep.* 3, 13–22 (2014).
26. Murphym, K., Travers, P. & Walport, M. *Immunobiología de Janeway*. (Mc Graw Hill, 2008).
27. Richards, N. & McMahon, S. B. Targeting novel peripheral mediators for the treatment of chronic pain. *Br. J. Anaesth.* 111, 46–51 (2013).
28. Mayo, L., Quintana, F. & Weiner, H. The innate immune system in demyelinating disease. *Immunol. Rev.* 248, 170–187 (2012).
29. Rotshenker, S. Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. *J. Neuroinflammation* 8, 109 (2011).

30. Gersch, C., Dewald, O., Zoerlein, M., Michael, L. & Entman, M. Mast cells and macrophages in normal C57/BL/6 mice. *Histochem Cell Biol* (2002).
31. Gurish, M. & Boyce, J. Mast cells: ontogeny, homing, and recruitment of a unique innate effector cell. *J Allergy Clin Immunol* (2006).
32. Hepworth, M., Daniłowicz-Luebert, E., Rausch, S., Metz, M. & Klotz, C. Mast cells orchestrate type 2 immunity to helminths through regulation of tissue-derived cytokines. *Proc Natl Acad Sci*
33. De Filippis, D. et al. Palmitoylethanolamide reduces granuloma-induced hyperalgesia by modulation of mast cell activation in rats. *Mol. Pain* 7, 3 (2011).
34. Brown, A., Ricci, M. & Weaver, L. NGF message and protein distribution in the injured rat spinal cord. *Exp. Neu.* (2004).
35. Viera, S. et al. A crucial role for TNF- α in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5. *Br J Pharmacol.* (2009).
36. Mantovani, A. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* (2004).
37. Wynn, T. a, Chawla, A. & Pollard, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496, 445–55 (2013).
38. Martínez-Barriocanal, Á., Comas-Casellas, E. & Sayós, J. CD300 Heterocomplexes, a New and Family-restricted Mechanism for Myeloid Cell Signaling Regulation. *J. Biol. Chem.* 285, (2010).
39. Clarck, G. et al. The CD300 molecules regulate monocyte and dendritic cell functions. *Immunobiology* (2009).
40. Alvarez-Errico, D., Sayós, J. & López-Botet, M. The IREM-1 (CD300f) Inhibitory Receptor Associates with the p85 subunit of Phosphoinositide 3-Kinase 1. *J. Immunol.* 178, 808–16 (2007).
41. Izawa, K., Yamanishi, Y. & Maehara, A. The receptor LMIR3 negatively regulates mast cell activation and allergic responses by binding to extracellular ceramide. *Immunity* 37, 827–839 (2012).
42. Borrego, F. The CD300 molecules: an emerging family of regulators of the immune system. *Blood* (2013).
 at <<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/121/11/1951.short>>
43. Seung-Chul, C., Simhadri, V. R. & Coligan, J. Cutting Edge: Mouse CD300f (CLM-1) recognizes outer-membrane exposed phosphatidylserine and can promote phagocytosis. *J. Immunol.* 187, 3483–3487 (2011).
44. Izawa, K. et al. Sphingomyelin and ceramide are physiological ligands for human LMIR3/CD300f, inhibiting Fc ϵ RI-mediated mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol* 133, 270–273 (2014).
45. Kay, M. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nat Rev Genet* 12, 316–328 (2011).
46. Matrobattista, E., Bravo, S., van der Aa, M. & Crommelin, D. Nonviral gene delivery systems: From simple transfection agents to artificial viruses. *Drug Discov. today Technol.* 2, 103–109 (2005).
47. Lundstrom, K. Latest development in viral gene therapy. *Trends Biotechnol* 21, 117–122 (2003).
48. Waheed, A. & Freed, E. HIV type 1 Gag as a target for antiviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* (2012).
49. Rodrigues, A., Alves, P. M. & Coroadinha, A. Production of retroviral and lentiviral gene therapy vectors: Challenges in the manufacturing of lipid enveloped virus. *Viral Gene Ther.*
50. Naldini, L. et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* (80-.). 272, 263–267 (1996).
51. VandenDriessche. Lentiviral vectors containing the human immunodeficiency virus type-1 central polypurine tract can efficiently transduce nondividing hepatocytes and antigen-presenting cells in vivo. (2002).
52. Heinzinger, N. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci* 91, 7311–7315 (1994).
53. Escors, D. & Breckpot, K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Arch Immunol Ther Exp* 52, 107–119 (2010).
54. Sen, D. Cellular unfolded protein response against viruses used in gene therapy. *Front. Microbiol.* 5, 250 (2014).
55. Suzuki, Y. Gene Regulatable Lentiviral Vector System. *Viral Gene Ther.* (2011). at <<http://www.intechopen.com/books/viral-gene-therapy/gene-regulatable-lentiviral-vector-system>>
56. Cavazzana-Calvo, M. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* (80-.). 302, 415–429 (2003).
57. Nguyen, D. H. et al. Immunoglobulin G (IgG) attenuates neuroinflammation and improves neurobehavioral recovery after cervical spinal cord injury. *J. Neuroinflammation* 9, (2012).

58. Fehlings, M. G. & Nguyen, D. H. Immunoglobulin G: A potential treatment to attenuate neuroinflammation following spinal cord injury. *J Clin Immunol* 30, 109–112 (2010).
59. Peluffo, H. et al. Efficient gene expression from integration-deficient lentiviral vectors in the spinal cord. *Gene Ther* 20, 645–657 (2013).
60. Moshkovits, I., Shik, D. & Itan, M. CMRF35-like molecule 1 (CLM-1) regulates eosinophil homeostasis by suppressing cellular chemotaxis. *Mucosal Immunol* 7, 292–303 (2013).