Agència
de Gestió d'Ajuts
Universitaris
i de Recerca

Memòria justificativa de recerca de les convocatòries BCC, BDH, BE, BP, CTP-AIRE, DEBEQ, FI, INEFC, i PIV

La memòria justificativa consta de les dues parts que venen a continuació:
1.- Dades bàsiques i resums
2.- Memòria del treball (informe científic)

Tots els camps són obligatoris

1.- Dades bàsiques i resums

Nom de la convocatòria
FI

Llegenda per a les convocatòries:

BCC	Convocatòria de beques per a joves membres de comunitats catalanes a l'exterior
BDH	Beques i ajuts postdoctorals del Programa DGR-Henkel KGaA
BE	Beques per a estades per a la recerca fora de Catalunya
BP	Convocatòria d'ajuts postdoctorals dins del programa Beatriu de Pinós
CTP-AIRE	Ajuts per accions de cooperació en el marc de la comunitat de treball dels Pirineus. Ajuts de mobilitat de personal investigador.
DEBEQ (Modalitat A3)	Beques de Cooperació Internacional i Desenvolupament
FI	Beques predoctorals per a la formació de personal investigador
INEFC	Beques predoctorals i de col·laboració, dins de l'àmbit de l'educació física i l'esport i les ciències aplicades a l'esport
PIV	Beques de recerca per a professors i investigadors visitants a Catalunya

Títol del projecte: ha de sintetitzar la temàtica científica del vostre document.
Estudio de los mecanismos terapéuticos en la inducción de tolerancia inmunológica en un modelo animal de esclerosis múltiple

Dades de l'investigador o beneficiari

Nom	Cognoms
Alba	Gómez Morago

Correu electrònic
agomez@ir.vhebron.net

Dades del centre d'origen

Institut de Recerca de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron

2009 FIC 010

Alba Gómez Morago

Nom i cognoms i signatura del/de la investigador/a

Vist i plau del/de la responsable de la sol·licitud

Agència
de Gestió d'Ajuts
Universitaris
i de Recerca

Número d'expedient
2009FI 00010

Paraules clau: cal que esmenteu cinc conceptes que defineixin el contingut de la vostra memòria.
Terapia Génica, Mecanismos de tolerancia inmunológica, células mieloides supresoras, células T reguladoras, Esclerosis multiple

Data de presentació de la justificació
03/06/2010

Resum del projecte: cal adjuntar dos resums del document, l'un en anglès i l'altre en la llengua del document, on s'esmenti la durada de l'acció

Resum en la llengua del projecte (màxim 300 paraules)
En una serie de estudios previos demostramos que la infusión de células de médula ósea (MO) modificadas genéticamente para la expresión del autoantígeno MOG40-55 en ausencia de mieloablación inducía tolerancia antígeno-específica en un modelo murino de esclerosis múltiple. También observamos que este efecto terapéutico no requería injerto hematopoyético.
Nos propusimos estudiar si el efecto tolerogénico está inducido por una subpoblación de células generadas durante la transducción de la MO y el papel de las células T reguladoras en la inducción de tolerancia.
Las células de MO fueron cultivadas y transducidas usando medio complementado con 20% FCS y medios condicionados como fuente de stem cell factor (SCF) e IL-3 murinos. Las diferentes poblaciones celulares se separaron por citometría de flujo y se analizó la capacidad supresora de las poblaciones candidatas. Por otro lado se analizó la presencia de células T reguladoras en bazo y SNC de los ratones recuperados despues de la infusión de células de MO transducidas.
A los cinco días de cultivo, la mayoría de células presentaban fenotipo mieloide (Mac-1+ Gr-1low/-: 31,9±10,2%; Mac-1+ Gr-1high: 26,0±3,3%). Ambos fenotipos se corresponden con dos subpoblaciones de células mieloides supresoras (MDSC, tipo monocítico y granulocítico respectivamente) descritas recientemente. Se estudió la capacidad de ambas poblaciones para suprimir la respuesta proliferativa específica de esplenocitos frente a MOG40-55 in vitro, observando una mayor capacidad de supresión de las MDSC monocíticas, que se correspondía con niveles significativamente superiores de actividad de las enzimas arginasa-1 y sintasa de óxido nítrico (ambos mecanismos supresores característicos de las MDSC).
A los 7 días del tratamiento no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células T reguladoras (Treg y Tr1) entre el grupo tratado (IiM) y los grupos control.
Describimos por primera vez la generación de MDSC a partir de cultivos estándar de transducción de células de MO. Los resultados obtenidos sugieren la participación de las células MDSC en la inducción de tolerancia antígeno-específica conseguida en nuestro modelo y el potencial terapéutico de éstas para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Creemos que estas células tienen un gran potencial para futuras terapias inmunomoduladoras en diversas enfermedades humanas.

Resum en anglès (màxim 300 paraules)
We previously reported that the infusion of murine bone marrow cells (BMC) expressing an autoantigen (MOG40-55) into non-myeloablated recipients induced tolerance to the autoantigen that prevented and improved experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), even in the absence of engraftment.
To this end, we have investigated the phenotype of BMC undergoing retroviral transduction, we sorted candidate cell subpopulations and analyzed their suppressive effects in vitro and the potential role of regulatory T cells in tolerance induction.
Murine BMC were transduced using our standard conditions (medium with 20% FCS, conditioned media containing murine stem cell factor and mIL-3. The candidate cell subpopulations were sorted and their supresión activity was analyzed. In addition, we analized the percentages of regulatory T cell in treated mice.
At day +5 the vast majority of the transduced cells cultured expressed myeloid markers (Mac-1+ Gr-1low/- (31,9±10,2%) or Mac-1+ Gr-1high (26±3,3%)). The phenotypes of these two myeloid cell subpopulations correspond to those of the two (monocyte-like and granulocyte-like, respectively) subtypes of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) that have been recently reported. To further characterize their functionality we analyzed the ability of transduced total BMC and the sorted candidate cell subpopulations to suppress the proliferative response of splenocytes from mice with EAE to autoantigen challenge.

Resum en anglès (màxim 300 paraules) – continuació -.
After transduction, total BMC and both myeloid cell subpopulations suppressed the proliferative T cell response in a dose-dependent manner. In addition, we found that the monocyte-like cells were significantly more suppressive than their granulocyte-like counterparts, and that suppression was also significantly higher if the cells were transduced with the autoantigen than with a control vector (in all cell subpopulations), which suggest that both non-specific and antigen-specific mechanisms contribute to the suppressive effect observed in vitro. Moreover, Mac-1+ Gr-1low/- cell population displayed higher levels of arginase-1 and nitric oxide synthase activities upon stimulation than the other cell subpopulations tested, as it has been reported for MDSC. Seven days after the therapy, we did not observed significant diferences in the percentatges of regulatory T cell (Treg and Tr1) when we compared the treated animals with their controls.
To the best of our knowledge, this is the first report demonstrating the generation of MDSC in standard hematopoietic transduction cultures. These results also suggest the participation of antigen-specific MDSC in our model of tolerance induction in EAE. We believe that genetically modified MDSC have therapeutic potential as immunodulators in human autoimmune diseases.

2.- Memòria del treball (informe científic sense limitació de paraules). Pot incloure altres fitxers de qualsevol mena, no més grans de 10 MB cadascun d'ells.

Introducción

La encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), un modelo de esclerosis múltiple, es una enfermedad inflamatoria y desmielinizante del sistema nervioso central mediado por células T que se induce en animales susceptibles mediante la inmunización con proteínas o péptidos de la mielina, provocando una parálisis ascendente.

En un proyecto anterior realizado en nuestro laboratorio se consiguió inducir tolerancia inmunitaria antígeno-específica frente un péptido encefalitogénico (péptido 40-55 de la glicoproteína mielínica de los oligodendrocitos –MOG_{40-55}-) en el modelo de EAE, expresando dicho péptido en el sistema hematopoyético murino mediante la infusión de células de MO transducidas con un vector retroviral que expresa el citado péptido (Eixarch et al. 2009).

La rápida recuperación observada en los ratones tratados nos hizo pensar que probablemente el efecto observado en estos ratones no era debido a progenitores con capacidad repobladora sino a otra población celular que estaría expresando el péptido de interés y que induciría los mecanismos de tolerancia periférica una vez han sido infundidas en el ratón.

Los principales mecanismos de tolerancia periférica son la anergia, la supresión y la ignorancia clonal. Pero actualmente el mecanismo más estudiado es la supresión mediada por células T reguladoras, que incluyen la células T reguladoras naturales (Treg) o células T reguladoras inducidas o de tipo 1 (Tr1), entre otras.

Las células Treg se caracterizan por la expresión de marcadores linfocitarios de superficie CD4 y CD25 y por la expresión del factor de transcripción FoxP3, y pueden ser generadas en el timo. Contrariamente, las células Tr1, que se caracterizan por la secreción de interleucinas 5 y 10 (IL-5 y IL-10) y TGF-beta, son inducidas de forma antígeno-específica en la periferia. La activación de éstas se da principalmente por contacto directo con células dendríticas inmaduras (iDC), que son de origen mieloide y se generan en la MO (Wakkach et al. 2003; Bacchetta et al. 2005; Battaglia et al. 2006; Dugast and Vanhove 2009).

Basándonos en la elevada presencia de células mieloides en los cultivos de MO transducida y en los altos niveles de IL-5 y IL-10 secretados por esplenocitos de ratones tratados, creemos que una población generada en los cultivos de MO activarían de forma específica las células Tr1, y que estas serían el principal tipo celular responsable de la tolerancia inducida en el modelo animal estudiado (Martinez-Forero et al. 2008).

Las principales poblaciones candidatas a mediar dicho efecto son las células mieloides supresoras (MDSC) y las células mesenquimales. Las MDSC constituyen una población heterogénea descrita recientemente sobretodo en pacientes y modelos animales de cancer, que se caracteriza por su capacidad de suprimir la respuesta T (Morecki et al. 2008). La población está formada por progenitores mieloides y por células mieloides inmaduras que en condiciones normales darían lugar a los diferentes linajes mieloides (macrófagos, granulocitos, células dendríticas ...) pero que en situaciones patológicas, como cáncer, infección, o enfermedades autoinmunes, etc., se acumulan en los órganos linfoides y en el lugar de actuación, activándose y suprimiendo la respuesta inmune adaptativa tanto de forma inespecífica como antígeno-específica (Gabrilovich and Nagaraj 2009).

Los mecanismos de supresión de la respuesta T por parte de las células mieloides supresoras se basan en la sobreexpresión de la arginasa-1 i los enzimas implicados en la producción de óxido nítrico y radicales de oxígeno provocando una disminución de L-arginina en el medio y un aumento de los radicales de oxígeno, lo que reduce la funcionalidad de las células T.

La heterogeneidad de la población hace que no haya un fenotipo único para esta población sino que depende del modelo animal o del tipo de muestra a estudiar, y esto hace que se requieran estudios funcionales para analizar estas poblaciones celulares.

Con todo, se han descrito marcadores comunes en los diferentes modelos. En el ratón, las MDSC se caracterizan por ser $CD11b^+$ y $Gr\text{-}1^+$ y por presentar bajos niveles de F4/80 y IL4Rα. Dentro de esta caracterización fenotípica podemos diferenciar dos subpoblaciones basándonos en la expresión diferencial de los dos epítopos reconocidos por el anticuerpo anti-Gr-1 (Ly6C y Ly6G), una población granulocítica ($CD11b^+$ $Ly6C^{low}$ $Ly6G^+$) y otra monocítica ($CD11b^+$ $Ly6C^{hi}$ $Ly6G^-$)(Youn et al. 2008).

Las células mesenquimales (MSC) són células multipotentes no hematopoyéticas que se localizan en la medula ósea, en sangre de cordon umbilical, placenta y en tejido adiposo, entre otros tejidos. La multipotencialidad que tienen le confiere la capacidad de diferenciarse a diferentes tejidos como tejido óseo, adiposo, cartilaginoso y músculo liso.

Aunque se han dedicado muchos esfuerzos para caracterizar estas células aun no se ha encontrado un marcador específico por lo que su fenotipo se basa en la combinación de varios marcadores de superficie. Aunque su fenotipo varía dependiendo del tipo de tejido del que se hayan obtenido todas

ellas tienen la característica común de no expresar marcadores hematopoyéticos como el CD45 o los marcadores de los diferentes linajes hematopoyéticos y de presentar marcadores de célula mesenquimal como el CD29 y el CD105 (Dugast and Vanhove 2009).

Las MSC poseen propiedades immunomoduladoras importantes en el mantenimiento de la tolerancia periférica, en el control de la autoinmunidad y en la tolerancia feto-materna, entre otras.

Objetivos

Los principales objetivos de este estudio son caracterizar fenotípica y funcionalmente las subpoblaciones de la MO transducida candidatas a mediar la inducción de tolerancia inmunitaria en el modelo de EAE y estudiar los mecanismos de acción de éstas, tanto *in vitro* como *in vivo*. Se investigará qué poblaciones celulares participan en la inducción de tolerancia *in vivo* y se estudiará la participación de las células T reguladoras en la inducción de tolerancia en dicho modelo.

Material y métodos

1- Vectores retrovirales

Los vectores retrovirales empleados en este trabajo han sido generados anteriormente en nuestro laboratorio a partir del vector retroviral SF91-IRES-EGFP (cedido por Christopher Baum, Hannover, Alemania) basado en el virus MoMuLV (Hildinger et al. 1999; Eixarch et al. 2009). Esta familia de vectores retrovirales está optimizada para una expresión elevada de transgenes en progenitores hematopoyéticos mieloides.

Los dos vectores retrovirales utilizados contenían la secuencia codificante para la Ii murina salvaje (SF91-Ii-IRES-EGFP, vector control) o la Ii murina con la secuencia que codifica para la región CLIP substituida por la que codifica para el péptido MOG_{40-55} (SF91-IiMOG-IRES-EGFP).

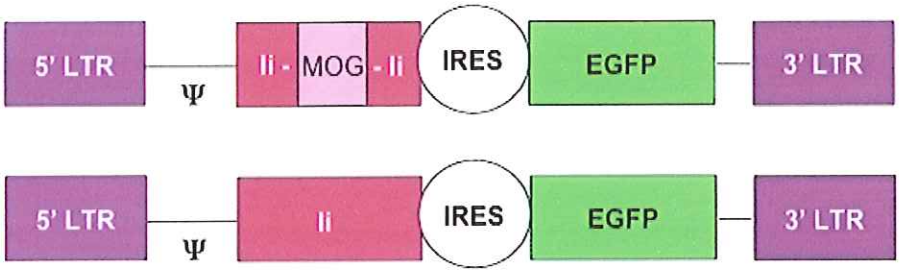

Fig. 1- Esquema de los vectores retrovirales usados. *El primer esquema corresponde al vector SF91-IiMOG-IRES-EGFP, que expresa la Ii murina con el autoantígeno MOG_{40-55} reemplazando la región CLIP, además de la EGFP. El otro vector (SF91-Ii-IRES-EGFP) se usó como control en los diferentes experimentos.*

2- Lineas celulares productoras de vectores retrovirales

En este trabajo se utilizaron dos líneas productores ecotrópicas derivadas de la línea empaquetadora NX-ecotrópica (derivada de la línea celular 293 de riñón embrionario humano), denominadas NX-e/Ii7 y NX-e/IiMOG23. Ambas líneas celulares contienen y expresan de forma estable tres elementos genéticos, el primero de ellos codifica para la glicoproteína de la envuelta del retrovirus ecotrópico (codificada en el gen *env*), con tropismo para células murinas, el segundo codifica para el resto de proteínas estructurales del virus y para las enzimas necesarias para el ciclo vital del virus (genes *gag* y *pol*), y el tercero es el vector retroviral, que contiene la secuencia terapéutica y que es diferente en cada línea. La línea NX-e/Ii7 contiene el vector retroviral SF91-Ii-IRES-EGFP y la NX-e/IiMOG23 el SF91-IiMOG-IRES-EGFP. Ambas fueron generadas en nuestro laboratorio y sus títulos virales son $0.8x10^6$ y $2x10^6$ partículas infecciosas/ml, respectivamente.

Las líneas celulares fueron mantenidas en cultivo en medio DMEM suplementado:

- 10% de FCS Gold
- 2 mM de L-glutamina
- 50 UI/ml de penicilina
- 50 µg/ml de estreptomicina

Se cultivaron en un incubador a 37ºC, 5% de CO_2 y 100% de humedad relativa.

3- Transducción y trasplante hematopoyético

3.1- Ratones

Como ratones donante de MO se utilizaron hembras de entre 6 y 10 semanas de edad de la cepa B6/SJL-*PtprcaPep3b/BoyJ* (Jackson Laboratorios; en adelante se referirá a esta cepa como B6/SJL), criada y mantenida en el estabulario del *Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron.* Se estabularon en salas con temperatura controlada (20-22ºC) y con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Los animales se mantuvieron y manipularon según la normativa europea y con la aprobación del *Comitè Ètic d'Experimentació Animal del Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron.*

Como ratones receptores se utilizaron hembras de 6 y 10 semanas de edad de la cepa C57BL/6J (Harlan). A su llegada, se distribuyeron en grupos de 5 ó 10 ratones por jaula y permanecieron en la sala de cuarentena del estabulario durante un período mínimo de una semana. Al terminar el período de cuarentena, los ratones se estabularon en *racks* ventilados. Las dos cepas comparten idéntico MHC ($H-2^b$) pero tienen distintas variantes alélicas del gen que codifica para la molécula CD45 (CD45.1 para la cepa donante y CD45.2 para la cepa receptora), que se expresa exclusivamente en las células nucleadas de origen hematopoyético, de forma que tras un trasplante las células del donante pueden diferenciarse de las del receptor mediante un simple marcaje con anticuerpos monoclonales específicos.

3.2- Obtención de células de MO

A los ratones donantes se les administró por vía intraperitoneal (i.p.) una dosis de 150 mg/kg de 5-fluorouracilo (5-FU; ICN Ibérica) en suero fisiológico, tal y como se indica en la Figura 2. Este tratamiento elimina las células que están en división y por tanto enriquece en progenitores hematopoyéticos más inmaduros (más quiescentes) y a su vez los induce a dividirse, condición indispensable para poder ser transducidos con vectores retrovirales.

A los 5 días de la administración del 5-FU, los ratones se sacrificaron mediante asfixia por CO_2. Seguidamente se procedió a la esterilización con etanol al 70% de la zona ventral de los animales y a su disección para extraerles ambas tibias, fémures y crestas ilíacas, limpiando los huesos de los tejidos adyacentes. Una vez extraídos, se mantuvieron en frío y se colocaron en un tubo de 50 ml (Nalgene Nunc™ International) conteniendo 10 ml de medio IMDM (PAA) suplementado con:

- 20% FCS Gold
- 2 mM de L-glutamina
- 50 UI/ml penicilina

- 50 µg/ml de estreptomicina

Trabajando en cabina de flujo laminar vertical, los huesos limpios de los tejidos adyacentes se colocaron en un mortero estéril con 6 ml de medio IMDM suplementado y seguidamente se disgregaron físicamente con la mano de mortero. Se procedió a recoger las células en un tubo de 50 ml filtrándolas previamente con un filtro de nylon de 70 µm (Becton-Dickinson). Después de varios lavados con medio IMDM para recoger las células liberadas del hueso, se centrifugaron 5 minutos a 453 g y se procedió a su contaje en la cámara de Neubauer usando solución de Türk como diluyente. Esta solución contiene colorante Giemsa y un 1% de ácido acético que permite el lisado de los eritrocitos y facilita el contaje de las células nucleadas. También se evaluó la viabilidad utilizando el colorante azul de tripano (0,4% azul de tripano en suero fisiológico) y contando el número de células vivas (no incorporan el colorante) y las muertas (que sí incorporan el colorante).

3.3- Transducción de células de MO

3.3.1- Tratamiento de las placas de cultivo con RetroNectin®

Con el fin de mejorar la eficiencia de transducción, antes de sembrar las células en las placas de cultivo de 6 pocillos (Nalgene Nunc™ International), éstas se incubaron con 1 ml de RetroNectin® (fragmento recombinante CH-296 de la fibronectina, Takara Shuzo, Co, LTD) diluida en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de 48 µg/ml durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez retirada la solución que contenía la fibronectina, las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con PBS más albúmina sérica bovina (BSA; Sigma Chemical CO.) al 2%. Finalmente, se lavaron con 1 ml de solución salina tamponada de Hank (HBSS, PAA) conteniendo 25 mM Hepes (PAA).

3.3.2- Preestimulación de las células de MO con citocinas

Las células de MO se cultivaron en placas de 6 pocillos pretratadas como se describe en el apartado anterior a una concentración de 10^6 CMN por ml en un volumen final de 2 ml. El medio utilizado para este tipo de cultivo fue IMDM suplementado con:

- 20% FCS Gold
- 2 mM de L-glutamina
- 50 UI/ml de penicilina
- 50 µg/ml de estreptomicina
- 10% de medio condicionado de la línea celular WEHI $3B^+$, fuente de IL-3 murina
- 8% de medio condicionado de la línea celular BHK/MKL, fuente de factor de crecimiento de células madre murino (mSCF) y cedida por S. Tsai (*Fred Hutchinson Cancer Research Center*, Seattle, WA, EUA).

La preestimulación con citocinas se llevó a cabo durante 48 horas en un incubador a 37ºC, 5% CO_2 y 100% de humedad relativa con la finalidad de estimular a las células progenitoras a dividirse y evitar su apoptosis.

3.3.3- Obtención del sobrenadante rico en retrovirus recombinantes

Las líneas de células productoras de retrovirus recombinantes NX-e/Ii7 y NX-e/IiMOG23 se descongelaron siguiendo las técnicas estándar de descongelación. Se cultivaron en el medio DMEM suplementado y se mantuvieron en cultivo, como se especifica en el apartado 2 de la sección Material y Métodos. Cuando llegaron a confluencia, se subcultivaron en un frasco de cultivo de volumen adecuado para poder obtener el volumen de sobrenadante necesario para la transducción. El día previo a la recogida del sobrenadante rico en vectores se cambió el medio habitual de crecimiento de las líneas NX-ecotrópicas productoras de vectores por el medio adecuado para el cultivo de las células diana a transducir (ver apartado 2.3.2, pero sin añadir los medios condicionados de las líneas celulares WEHI $3B^+$ y BHK/MKL). A las 16-18 horas de haber cambiado el medio de cultivo, éste se recogió y se filtró usando un filtro de 0,45 µm para evitar el posible paso de células productoras de vectores. Los sobrenadantes se usaron inmediatamente o se alicuotaron y criopreservaron a -80ºC hasta que hubo necesidad de utilizarlos.

3.3.4- Transducción de células de MO con vectores retrovirales

Se realizaron dos ciclos de transducción en dos días consecutivos usando una multiplicidad de infección (MOI) aproximada de 1 en cada ciclo (Fig. 2). Se recogió el 90% del volumen de medio de cada pocillo en un tubo de 50 ml y se centrifugó a 453 g a 4ºC. El pellet celular se resuspendió en la siguiente mezcla:

- 10% de medio condicionado WEHI
- 8% de medio condicionado BHK/MKL
- 4 µg/ml de sulfato de protamina
- 82% de sobrenadante de la línea productora de retrovirus

En cada pocillo se restauró el volumen con medio rico en virus recombinantes en el que se resuspendieron las células que se habían recogido. Las placas se centrifugaron a 652 g durante 1h a 32ºC. Al día siguiente se repitió este mismo procedimiento.

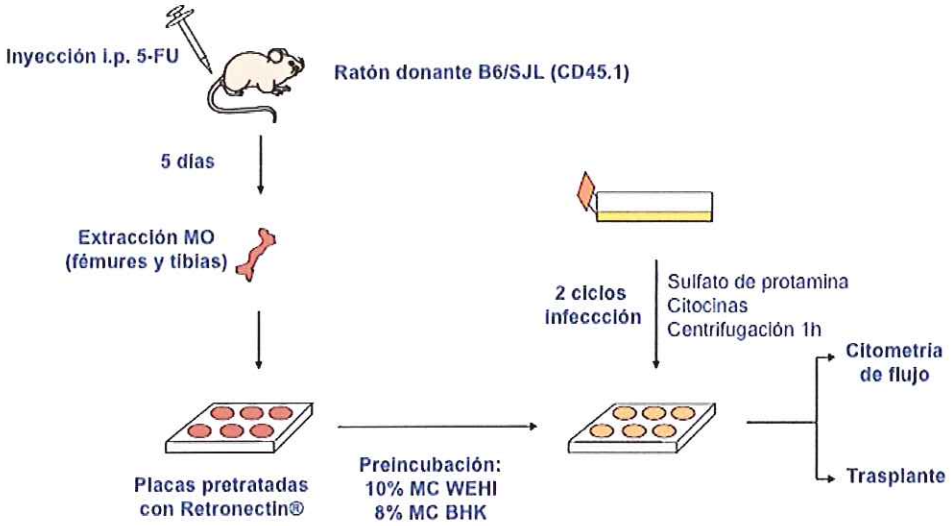

Fig. 2- Esquema de la obtención y transducción de la MO murina. *Ver texto.*
5-FU: 5-fluorouracilo; i.p: intraperitoneal; MC: medio condicionado.

3.4- Transplante de células de MO

Transcurridas 24 horas después del segundo ciclo de transducción, las células en cultivo se despegaron del plástico usando Buffer Enzyme-free PBS-based (Gibco BRL) y se recogieron en un tubo de 50 ml. Después de lavarlas con PBS, se contaron en una cámara de Neubauer diluidas en solución de Türk. La viabilidad se evaluó con azul de tripano como ya se ha descrito anteriormente. A continuación fueron incubadas en 10 UI de ADNasa (Sigma Chemical CO) por cada 10^6 CMN durante 15' a 25°C. Después de lavarlas se resuspendieron en el volumen adecuado de PBS para finalmente inyectarlas i.v. por la vena lateral de la cola a unas dosis de 1 x 10^6 CMN por ratón en un volumen de 200 µl.

4- Inducción de la EAE y seguimiento clínico

Se inmunizaron ratones hembra de entre 6 y 10 semanas de edad de la cepa C57BL/6J (Harlan), previa anestesia con 37 mg/kg de ketamina (Ketolar, Parke-Davis) y 5,5 mg/kg de xilacina (Rompun, Bayer), mediante una inyección s.c. de una solución que contenía 200 µg de péptido MOG_{40-55} (sintetizado por la *Secció de Proteòmica, Serveis Científicotècnics de la Universitat Pompeu Fabra*) diluido en suero salino y emulsionado con adyuvante completo de Freund (Sigma Chemical CO.) conteniendo 4 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difca Laboratorios). Cada ratón recibió 50 µl de la emulsión en cuatro puntos cerca de los ganglios linfáticos inguinales y axilares. El mismo día de la inmunización y a las 48h se les administró 500 ng de toxina pertussis (Tp) (Sigma Chemical CO.) en un volumen final de 200 µl por vía i.v. Como controles se incluyeron animales inmunizados de igual forma pero sin péptido encefalitogénico. Todos los animales de pesaron y examinaron diariamente para evaluar la presencia y gravedad de los signos clínicos según la siguiente escala:

Generalitat de Catalunya
Departament d'Innovació,
Universitats i Empreses

0 – Ausencia de signos clínicos

0,5 – Parálisis parcial de la cola (zona distal)

1 – Parálisis total de la cola

2 – Paraparesia de una o de ambas extremidades traseras

3 – Paraplejia trasera

4 – Tetraparesia

5 – Tetraplejia

6 – Muerte por EAE

5- Obtención de tejidos y células a estudiar

5.1- Obtención de los tejidos

Los ratones se sacrificaron mediante asfixia con CO_2 y a continuación se procedió a la esterilización con etanol al 70% de la zona ventral de los animales y a su disección para extraerles el bazo, que se mantuvo en frío en medio IMDM suplementado, el cerebro y la médula espinal, que se guardaron en un tubo de 50 ml con PBS 1X frío.

5.2- Obtención de los esplenocitos

El bazo de colocó en una placa de *Petri* de 6 cm con un filtro de nylon de 70 µm (Becton-Dickinson) y 2 ml de medio IMDM suplementado y se disgregó con la ayuda del émbolo de una jeringuilla de 1 ml. Las células se recogieron en tubos de 50 ml, se centrifugaron 5' a 453 g y se procedió a su contaje en la cámara de Neubauer usando solución de Türk como diluyente.

5.3- Obtención de células del SNC (Gradiente de Percoll®)

El cerebro y la médula espinal se colocaron en una placa de *Petri* de 10 cm con un filtro de nylon de 70 µm (Becton-Dickinson) y 10 ml de PBS 1X. Se cortaron en fragmentos y se disgregaron con la ayuda de un émbolo de una jeringuilla de 1 ml. Se recogió la suspensión celular en un tubo de 50 ml y se centrifugó 9' a 390g. Las células se resuspendieron en 20 ml de Percoll® (Sigma Chemical CO.) al 30% y con mucho cuidado se colocaron sobre 10 ml de Percoll® al 70% en un tubo de 50 ml. Este se centrifugó 20' a 390g y se recuperó el anillo de células que se forma en la interfase del tubo de Percoll® (figura 3). Las células se lavaron con PBS 1X para eliminar los restos de Percoll® centrifugándolas 9' a 390g y se contaron en la cámara de Neubauer usando solución de Türk como diluyente.

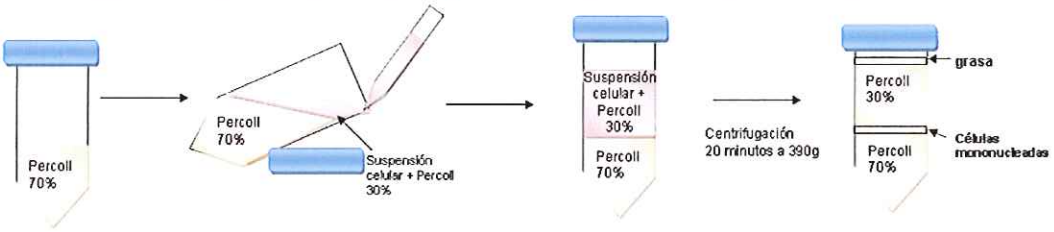

Figura 3: Esquema del gradiente de Percoll®. Ver texto

6- Ensayo de supresión de la proliferación

Para analizar la capacidad de la MO tranducida y de los poblaciones candidatas de suprimir la proliferación de espelenocitos se realizo un cocultivo de esplenocitos y células de MO tranducidas en medio IMDM suplementado:

- 10% HyClone
- 2mM de L-glutamina
- 50UI/ml de penicilina
- 50µg/ml de estreptomicina
- 2 µM de β-Mercaptoetanol (Sigma Chemical CO)
- 5 µg/ml de péptido MOG_{40-55}

Los esplenocitos (SPL) se cultivaron a una concentración de $1x10^6$ CMN por ml en presencia de diferentes concentraciones de células de MO tranducidas que se correlacionaban con las ratios 8:1 a 1:4 (MO:SPL) o de las poblaciones purficadas con ratios 2:1 a 1:16 (población purificada:SPL). Se mantuvieron en cultivo a 37°C, 5% de CO_2 y 100% de humedad relativa.

Como controles de proliferación se cultivaron los esplenocitos solos en medio de cultivo (control negativo) o en presencia de 5 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA; Sigma CO.) como control positivo.

A las 48 h se añadió 1 µCu de timidina tritiada (^{3}H-Thymidine, Amersham) para marcar las células que estén en división y 18 h después se cuantificaron los niveles de radiactividad en un contador beta.

7- Análisis bioquímico

7.1- Determinación de la actividad arginasa

La actividad arginasa se mide mediante un método colorimétrico que detecta la urea formada por la reacción catalizada por la arginasa sobre el substrato L-arginina (figura 4) (Corraliza et al. 1994).

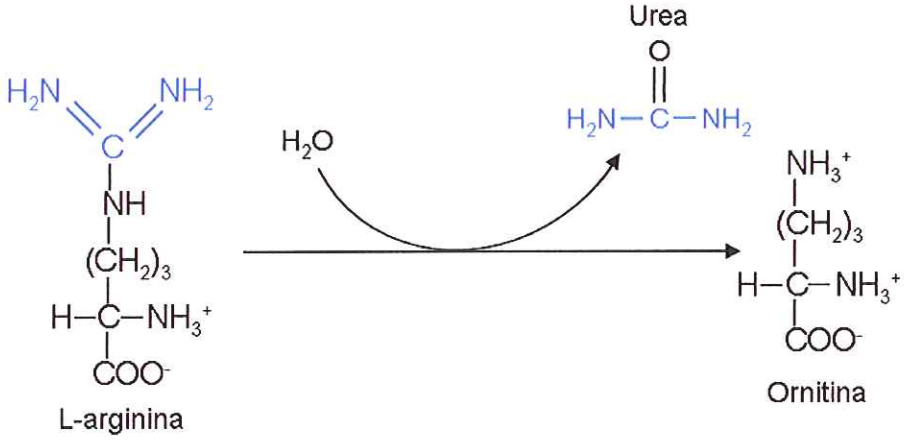

Figura 4: Reacción enzimática catalizada por la arginasa.

Para analizar la actividad arginasa en las células MO transducidas y de las poblaciones candidatas se pusieron esta en cultivo a una densidad de $1x10^6$ CMN por ml en placas de 96 pocillos.

Se cultivaron en medio MEM-α (Gibco) sin rojo de fenol suplementado:

- 10% FCS Gold
- 2 mM de L-glutamina

- 50 UI/ml de penicilina
- 100 UI/ml de INF-γ
- 100 ng/ml de lipopolisacárido (LPS, Sigma CO.)

Las células se mantuvieron en cultivo durante 24 h en un incubador a 37ºC, 5% de CO_2 y 100% de humedad relativa.

Como control negativo se utilizó las mismas células cultivadas en ausencia de INF-γ y LPS y como control positivo se utilizó la línea celular WEHI cultivada con el mismo medio de cultivo en presencia de INF-γ y LPS.

Pasado este tiempo se procedió a analizar la actividad arginasa en estas células de la siguiente manera:

1. Retiramos el medio de cultivo y añadimos 75 µl de una solución de TritonX-100 al 0.1% en agua y agitamos mediante un agitador de placas durante 30' a temperatura ambiente.
2. Añadimos 75 µl de Tris-HCl 25 mM pH 7.4 y lisamos las células con la ayuda de una micropipeta.
3. Pasamos 50 µl del lisado a un tubo Eppendorf y añadimos 5 µl de cloruro de manganeso ($MnCl_2$, Sigma CO.) (coenzima de la arginasa) y lo incubamos 10' a 55ºC para activar la enzima.
4. Una vez activada la arginasa, añadimos 25 µl de L-arginina 0.5 M pH 9.5 (Sigma CO.) y la incubamos a 37ºC durante 2 h.
5. Pasado este tiempo paramos la reacción añadiendo 240 µl de una solución ácida (H_2O: H_3PO_4 (85%): H_2SO_4 (96%) (7:3:1))
6. Por último, para cuantificar colorimétricamente la formación de urea añadimos 10 µl de una solución de α-isonitrosopropiofenona (α-ISPF) al 6% en etanol absoluto, que hará que la urea precipite, y lo calentamos durante 30' a 95-100ºC para disolver los precipitados obteniendo una solución de color rosa-violeta, dependiendo de la concentración de urea.
7. Ponemos 100 µl de la muestra en una placa de ELISA y medimos la absorbancia óptica a 550 nm.

En cada experimento se realizó de forma paralela una curva patrón utilizando cantidades crecientes de urea 0.01 mg/ml hasta 7.5 mg/ml diluida en la solución Tris-HCl 25mM. A 50 µl de cada punto de la curva se le añadieron 240 µl de la solución ácida y 25 µl de α-ISPF i se prosiguió desde el punto 7.

La actividad enzimática se expresa en miliunidades (mU) teniendo en cuenta que una unidad de arginasa es la cantidad de enzima que produce 1 µmol de urea por minuto a 37ºC y por millón de células.

7.2- Cuantificación de nitritos

El óxido nítrico, producto de la reacción de la enzima iNOS, se mide en forma de nitritos, según la reacción de Griess (Ding et al. 1988).

Para cuantificar la cantidad de nitritos producidos en nuestros cultivos de MO se utilizo el kit *Nitrite/Nitrate Assay Kit, colorimetric* (Sigma CO.).

Se cultivaron las células tal y como se ha explicado en el apartado 7.1, pasadas las 24 h se recogió el medio de cultivo y se prosiguió siguiendo el protocolo recomendado por el kit:

1. Centrifugamos el medio de cultivo a 1000g durante 15'.
2. Añadimos 80 µl de medio de cultivo y 20 µl de *Buffer Solution* en cada pocillo de la placa de 96 pocillos.
3. Añadimos a cada pocillo 50 µl de *Griess Reagent A.*
4. Añadimos 50 µl de *Griess Reagent B*, mezclamos bien con la ayuda de la micropipeta y dejamos incubar 10' a temperatura ambiente.
5. Medimos la absorbancia óptica a 550 nm.

Para determinar la concentración de NO_2^- se utilizaron diferentes concentraciones de $NaNO_2$ tal y como indica el kit.

8- Análisis por citometria de flujo

8.1- Marcaje de células hematopoyéticas por técnicas de inmunofluorescencia

Dependiendo del marcador celular a analizar se siguió uno de los protocolos descritos a continuación:

8.1.1- Marcaje de superficie directo

1. Lavar las células (0,5 x 10^6 CMN de los tejidos hematopoyéticos o 50 µl de SP) con 1 ml de PBS + BSA 1% + azida sódica 0,1% (PBA-azida).
2. Bloqueo de los receptores Fc: añadir un 10% de suero de ratón o bien 1 µl del anticuerpo de rata anti-CD16/CD32 de ratón.
   Incubar 10' a temperatura ambiente.
3. Añadir los anticuerpos específicos y los controles de isotipo conjugados con fluorocromos.
   Incubar 30' a 4ºC en la oscuridad.
4. Lavar con 1 ml de PBA-azida.
5. Lisar los eritrocitos con la solución de lisis *Pharm Lyse solution* (BD Pharmingen).
   Incubar 10' a 37ºC.
6. Lavar con 1 ml de PBA-azida.
7. Resuspender en 200-300 µl PBA-azida.
8. Adquirir en el citómetro de flujo.

8.1.2- Marcaje de superficie indirecto

1. Lavar las células (0,5 x 10^6 CMN de los tejidos hematopoyéticos o 50 µl de SP) con 1 ml de PBA-azida.
2. Bloqueo de los receptores Fc: añadir un 10% de suero de ratón o bien 1 µl del anticuerpo de rata anti-CD16/CD32 de ratón.
   Incubar 10' a temperatura ambiente.
3. Añadir los anticuerpos específicos y los controles de isotipo conjugados con biotina
   Incubar 30' a 4ºC.
4. Lavar con 1 ml de PBA-azida.
5. Añadir la estreptavidina conjugado con un fluorocromo.
   Incubar 30' a 4ºC en oscuridad.

6. Lavar con 1 ml de PBA-azida.
7. Lisar los eritrocitos con la solución de lisis *Pharm Lyse solution* (BD Pharmingen).
   Incubar 10' a 37°C.
8. Lavar con 1 ml de PBA-azida.
9. Resuspender en 200-300 µl PBA-azida.
10. Adquirir en el citómetro de flujo.

8.1.3- Marcaje intracelular directo

1. Lavar las células (0,5 x 10^6 CMN de los tejidos hematopoyéticos o 50 µl de SP) con 1 ml de PBA-azida.
2. Bloqueo de los receptores Fc: añadir un 10% de suero de ratón o bien 1 µl del anticuerpo de rata anti-CD16/CD32 de ratón.
   Incubar 10' a temperatura ambiente.
3. Fijar y permeabilizar: añadir 250 µl de *Cytofix/Cytoperm 1x solution* (BD Pharmingen).
   Incubar 20' a 4°C.
4. Lavar dos veces con 1 ml de *Perm/Wash buffer* (BD Pharmingen).
5. Resuspender en 50 µl *Perm/Wash buffer.*
   Marcaje intracelular: añadir el anticuerpo específico y el control de isotipo conjugados con fluorocromos. Incubar 30' a 4°C.
6. Lavar dos veces con 1 ml de *Perm/Wash buffer.*
7. Resuspender en 200-300 µl PBA-azida.
8. Adquirir en el citómetro de flujo.

8.1.4- Marcaje de citoquinas intracelulares

1. Cultivar 2x10^5 CMN hematopoyéticas o células de una población pura en 200 µl de medio de cultivo (IMDM, 10% suero HyClone, 2mM de L-Glutamina, 50 UI/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina, 2 µM de β-Mercatoetanol) y en presencia de 10 ng/ml de PMA (Sigma Chemical CO.) y 500ng/ml de ionomicina durante 3 h.
2. Anadir 1.6 µl de GolgiStop (BD Pharmingen) y dejar incubar surante 6 h en un incubador a 37°C, 5% de CO_2 y 100% de humedad.
3. Iniciar el marcaje de superficie tal y como se ha descrito en el apartado 5.1.1.
4. Añadir 100 µl de PBA-azida + 4% formaldehído y dejar actuar durante 20' a temperatura ambiente para fijar las células.
5. Lavar con 1 ml de PBA-azida.
6. Resuspender las células en 150 µl de *Saponin Buffer* (PBA-azida +0.5% Saponina (Sigma Chemical CO.) y dejar actuar 10' a temperatura ambiente.
7. Añadir los anticuerpos anti-citoquinas conjugador con fluorocromos y incubar durante 30' a temperatura ambiente.
8. Lavar con 1 ml de PBA-azida.
9. Resuspender en 200-300 µl PBA-azida.
10. Adquirir en el citómetro de flujo.

8.2- Eficiencia de transducción

Antes del trasplante, 24 h después del segundo ciclo de transducción, se separaron 10^5 CMN del cultivo para evaluar la eficiencia de transducción mediante el análisis de la expresión del gen marcador EGFP por citometría de flujo. El análisis se hizo descartando las células muertas mediante marcaje simultáneo con el marcador de viabilidad 7-aminoactinomicina D (7-AAD; Molecular Probes) a 1 mg/ml. Este colorante es capaz de entrar dentro de la célula e intercalarse en el ADN si la membrana plasmática no está intacta, de forma que solamente se tiñen las células apoptóticas o muertas, pudiéndolas excluir del análisis y evitando así la interferencia de la autofluorescencia que éstas emiten.

8.3- Linajes y poblaciones hematopoyéticas

8.3.1- Fenotipo medula ósea.

Para el estudio del fenotipo de la MO transducida con vectores retrovirales se realizaron marcajes directos e indirectos de células de MO cultivadas con los siguientes anticuerpos:

Tabla 1: Marcaje de linaje hematopoyético y población eritroide

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	µg por 10^6 células	Casa comercial
CD3	APhC	IgG1 de hamster	145-2C11	0.2	BD Pharmingen
CD4	APhC	IgG2a de rata	RM4-5	0.2	Caltag
CD8	APhC	IgG2a de rata	53-6.7	0.56	BioLegend
CD11b	APhC	IgG2b de rata	M1/70	0.2	BioLegend
CD19	APhC	IgG2a de rata	6D5	0.05	BioLegend
Gr-1	APhC	IgG2b de rata	RB6-8C5	0.2	BD Pharmingen
Ter119	Pe/Cy5	IgG2b de rata	TER-119	0.2	BD Pharmingen
CD45.1	APhC/Cy7	IgG2a de ratón	A20	0.2	BioLegend

Tabla 2: Marcaje de linfocitos T y células NK

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	µg por 10^6 células	Casa comercial
CD3	PE	IgG2a de rata	CT-CD3	0.2	Caltag
CD4	Biotina	IgG2a de rata	RM4-5	0.2	Caltag
CD8	APhC	IgG2a de rata	53-6.7	0.56	BioLegend
NK1.1	PE/Cy7	IgG2a de ratón	PK135	0.4	eBioscience
Estreptavidina	PerCP	-	-	0.2	BD Pharmingen

Tabla 3: Marcaje de linfocitos B

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	µg por 10^6 células	Casa comercial
CD19	APhC	IgG2a de rata	6D5	0.02	Biolegend
B-220	Biotina	IgG2a de rata	RA3-6B1	0.13	eBioscience
Estreptavidina	PerCP	-	-	0.13	BD Pharmingen

Tabla 4: Marcaje de poblaciones mieloides

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	µg por 10^6 células	Casa comercial
CD11b	APhC	IgG2b de rata	M1/70	0.2	BioLegend
CD11c	PerCP	IgG1 de hamster	N418	0.1	BioLegend
CD40	PE	IgG2a de rata	3/23	0.4	BD Pharmingen
CD80	PE	IgG2 de rata	16-12A1	0.4	BD Pharmingen
CD86	PE	IgG2a de rata	GL1	0.4	BD Pharmingen
Gr-1	PE/Cy7	IgG2b de rata	RB6-8C5	0.4	BioLegend
I-A^b	PE	IgG2a de ratón	AF6-120.1	0.4	BioLegend
H-$2K^b$	PE	IgG2a de rata	36-7-5	0,4	BioLegend

8.3.2- Análisis de células T reguladoras

Para el estudio de las células reguladoras, tanto las naturales (Treg) como las inducidas (Tr1), se realizaron marcajes directos de superficie e intracelular y de citoquinas intracelular de células de bazo y de células $CD4^+$ purificadas de bazo (EasySep, StemCell Technologies) con los siguientes anticuerpos:

Tabla 5 : Marcaje de células T reguladoras naturales (Treg)

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	µg por 10^6 células	Casa comercial
CD4	APhC/Cy7	IgG2a de rata	GK1.5	0.4	BioLegend
CD25	PE/Cy7	IgG1 de rata	PC61.5	2.8	eBioscience
CD45RB	Biotina	IgG2a de rata	C363.16A	0.12	eBioscience
FoxP3	APhC	IgG2a de rata	FJK-16S	0.2	eBioscience
Estreptavidina	PE	-	-	0.12	BD Pharmingen

Tabla 6: Marcaje de células T reguladoras inducidas (Tr1)

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	µg por 10^6 células	Casa comercial
CD4	APhC/Cy7	IgG2a de rata	GK1.5	0.4	BioLegend
IL-4	APhC	IgG1 de rata	11B11	0.25	BioLegend
IL-10	PE	IgG1 de rata	JES5-2A5	0.12	Caltag
IL-17	APhC	IgG1a de rata	TC11-18H10.1	0.25	BioLegend
IFN-γ	APhC	IgG1a de rata	XMG1.2	0.25	BioLegend

8.4- Células Mieloides Supresoras (MDSC)

Para el estudio de la población de células mieloides supresoras en los cultivos de MO se realizaron marcajes directos e indirectos de células de MO cultivadas con los siguientes anticuerpos:

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	µg por 10^6 células	Casa comercial
CD11b	APhC	IgG2b de rata	M1/70	0.2	BioLegend
CD124	PE	IgG2a de rata	mILR-M1	0.2	BD Pharmingen
Gr-1	PE/Cy7	IgG2b de rata	RB6-8C5	0.4	BioLegend
F4/80	PerCP	IgG2a de rata	BM8	0.4	BioLegend

8.5- Células mesenquimales

Para analizar la presencia de células con fenotipo mesenquimal se realizaron marcajes directos e indirectos de células de MO cultivadas con los siguientes anticuerpos:

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	µg por 10^6 células	Casa comercial
CD29	FITC	IgMk de hamster	Ha2/5	0.2	BD Pharmingen
CD44	Biotina	IgG2b de rata	IM7	0,4	BioLegend
CD45	APhC /Cy7	IgG2a de ratón	A20	0.4	BioLegend
CD90.2	PE	IgG2a de ratón	53-2.1	0.2	BD Pharmingen
CD105	PE	IgG2a de rata	MJ7/18	0.56	BioLegend
I-A^b	PE	IgG2a de ratón	AF6-120.1	0.4	BioLegend
H-$2K^b$	PE	IgG2a de rata	36-7-5	0.4	BD Pharmingen

8.6- Análisis y valoración de los datos citométricos

Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCanto (Becton-Dickinson) equipado con dos láseres, uno de argón (azul, emite a 488 nm) y uno de helio-neón (rojo, emite a 633 nm) y ocho fotomultiplicadores: SS (cuantifica la complejidad celular), FS (cuantifica el tamaño celular) y seis detectores de fluorescencia: FL-1 (530 nm), FL-2 (585 nm), FL-3 (690 nm), FL-4 (>774 nm), FL-5 (>670 nm) y FL-6 (>774 nm). Los cuatro primeros detectores de fluorescencia detectan las fotones producidos por la excitación de fluorocromos con el láser azul, mientras que los dos últimos detectan los fotones emitidos por la excitación de fluorocromos con el láser rojo. Esta configuración permite el análisis simultáneo de seis fluorescencias.

Una vez adquiridas las muestras, se procedió a analizar y valorar los datos obtenidos con el programa de análisis *FCSExpres v3.0* (De Novo Software). Según el tipo de marcaje de inmunofluorescencia realizado se usaron distintas combinaciones de los parámetros mencionados, representados en histogramas biparamétricos. En primer lugar y en todos los casos se combinaron los parámetros FS y SS para definir morfológicamente la población celular a estudiar. En segundo lugar se combinaron distintos parámetros en función del marcaje realizado:

- *Eficiencia de transducción*: en un segundo histograma se combinó SS con 7-AAD (FL-3) para excluir las células muertas o apoptóticas de los histogramas siguientes. En un tercer histograma se combinaron los parámetros SS con EGFP (FL-1), lo que permitió determinar el porcentaje de células viables que expresaban EGFP.

- *Fenotipo MO*:
  - *Marcaje de linaje hematopoyético y población eritroide:* una vez definida la población total con los parámetros SS y FS y la población transducida ($EGFP^+$), se combinó el parámetro Linaje-APhC (FL-5) (mezcla realizada en el laboratorio de los anticuerpos CD3, CD4, CD8, CD11b, CD19, Gr-1 conjugados con el fluorocromo APhC) con SS para definir la población que presentaba ausencia de linaje (Lin^-). Una vez seleccionada la población Lin^- se analizó la presencia de eritrocitos combinando los parámetros CD45.1-APhC/Cy7 (FL-6) con Ter119-PE/Cy5 (FL-3).

  - *Marcaje de células T y NK:* después del histograma para definir la población se combinó el parámetro CD3-PE (FL-2) con CD4-PerCP (FL-3) o con CD8-APhC (FL-5) y también el parámetro CD4-PerCP con CD8-APhC para analizar los diferentes estados de maduración de la población de células T. Para el análisis de la población de células NK se hicieron dos histogramas en los que se combinaban los parámetros NK1.1-PE/Cy7 (FL-4) con SS o con CD3-PE. Estas combinación de parámetros se realizó tanto sobre la población total como sobre la población EGFP+ seleccionada en un histograma previo donde se combinó el parámetro EGFP (FL-1)

con el SS. De esta forma podíamos analizar la presencia de células T y NK en la población total como, así como las transducidas con el vector retroviral.

- *Marcaje de células B:* una vez definida la población total y la $EGFP^+$,se combinó el parámetro B-220-PerCP con CD19-APhC para poder analizar las diferentes subpoblaciones de células B tanto en la población tranducida ($EGFP^+$) como en la total.

- *Marcaje de células mieloides:* una vez seleccionada la población a analizar (población total o $EGFP^+$)

- Análisis de células T reguladoras:
  - *Células T reguladoras naturales (Treg):* después de definir la población total se combinaron los parámetros CD4-APhC/Cy7 (FL-6) con CD45RB-PerCP (FL-3) para seleccionar las población $CD4^+$ $CD45RB^{low}$ descrita como una población enriquecida en células T reguladoras. Una vez seleccionada dicha población se combinaron los parámetros CD25-PE/Cy7 (FL-4) con FoxP3 (FL-2) para así poder analizar la población de células Treg .

  - *Células T reguladoras inducidas (Tr1):* una vez definida y seleccionada la población total se combinó el parámetro CD4-APhC/Cy7 (FL-6) con el SS y se seleccionó la población $CD4^+$ para después poder analizar la secreción de citoquinas en esta población combinando el parámetro IL-10-PE (FL-2) con los parámetros IL-4, IL-17 e IFN-γ todos ellos conjugador con APhC (FL-5). Así podemos analizar la población Tr1 que se define como $CD4^+$ $IL\text{-}10^+$ $IL4^-$.

- Células mieloides supresoras (MDSC): después de definir la población se combinó el parámetro CD11b-APhC (FL-5) con Gr-1-PE/Cy7 (FL-4) y se definió la población que era positiva para los dos parámetros ($CD11b^+$ $Gr1^+$) y la que era positiva para CD11b y tenía baja expresión para Gr-1. Una vez seleccionadas las dos poblaciones se realizaron dos histogramas en los que se combinaron los parámetros CD124-PE (FL-2) y F4/80-PerCP (FL-3) con SS para analizar la presencia del receptor de la IL-4 y del marcadore mieloide y así poder definir la población MDSC.

- Células mesenquimales: una vez definida la población total y la $EGFP^+$ se combino el parámetro Linaje-APhC con CD45.1-APhC/Cy7 y se definió la población negativa para ambos como la población enriquecida en células mesenquimales, de aquí se analizaron una serie de parámetros para definir la población mesenquimal, primero se combinó el parámetro CD29-FITC (FL-1) con CD44-PerCP (FL-3), se seleccionó la población doble positiva y en ella se analizó la expresión de CD105, CD90.1, MHC-I ($H2k^b$) y MHC-II ($I\text{-}A^b$) (todos conjugados con PE (FL-2)) combinándolos, por separado, con SS.

9- Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa informático GraphPad Prism v4.0 (GraphPad *software*, Inc.), con el que también se generaron las figuras. Se aplicó una prueba parametrica, *t* de Student, en todos los resultados obtenidos y se consideró que las diferencias eran significativas cuando la *p* era inferior a 0,05.

Resultados

1- Determinación del fenotipo de la MO transducida.

Con el objetivo de caracterizar el fenotipo de la población celular responsable de la inducción de tolerancia inmunológica observada en el modelo de EAE se procedió, inicialmente, a analizar el fenotipo de la MO transducida con los vectores retrovirales, para ellos se realizaron una serie de cultivos de MO y 24 h después de la segunda tanda de transducción se analizó el fenotipo mediante citometría de flujo.

Se analizaron marcadores de linaje T, B, mieloide y eritroide, tanto al inicio del cultivo como al final (día +5), equivalente a lo que se infunde a los animales. En este momento se pueden identificar tres poblaciones mayoritarias en los cultivos de MO, dos con fenotipo mieloide ($CD11b^+$ $Gr1^{low/-}$ y $CD11b^+$ $Gr1^+$), que representan el 31,9 $\pm$ 10,2% y el 26 $\pm$ 3,3% de la población total, y una tercera que presentaba ausencia de marcadores de linaje hematopoyético (Lin^- $CD45^-$), y que supone un 13,5 $\pm$ 4,2% (figura 5a). El resto de poblaciones hematopoyéticas no estaban apenas representadas a día +5 de cultivo.

Dichas poblaciones son las que mayor eficiencia de transducción presentaban (32,72 $\pm$ 4,13%, 14,93 $\pm$ 3,56%, 14,67 $\pm$ 4,75%, respectivamente) lo que nos sugería indirectamente que podrían ser las mejores candidatas a mediar la inducción de tolerancia observado en el modelo de EAE (figura 5b).

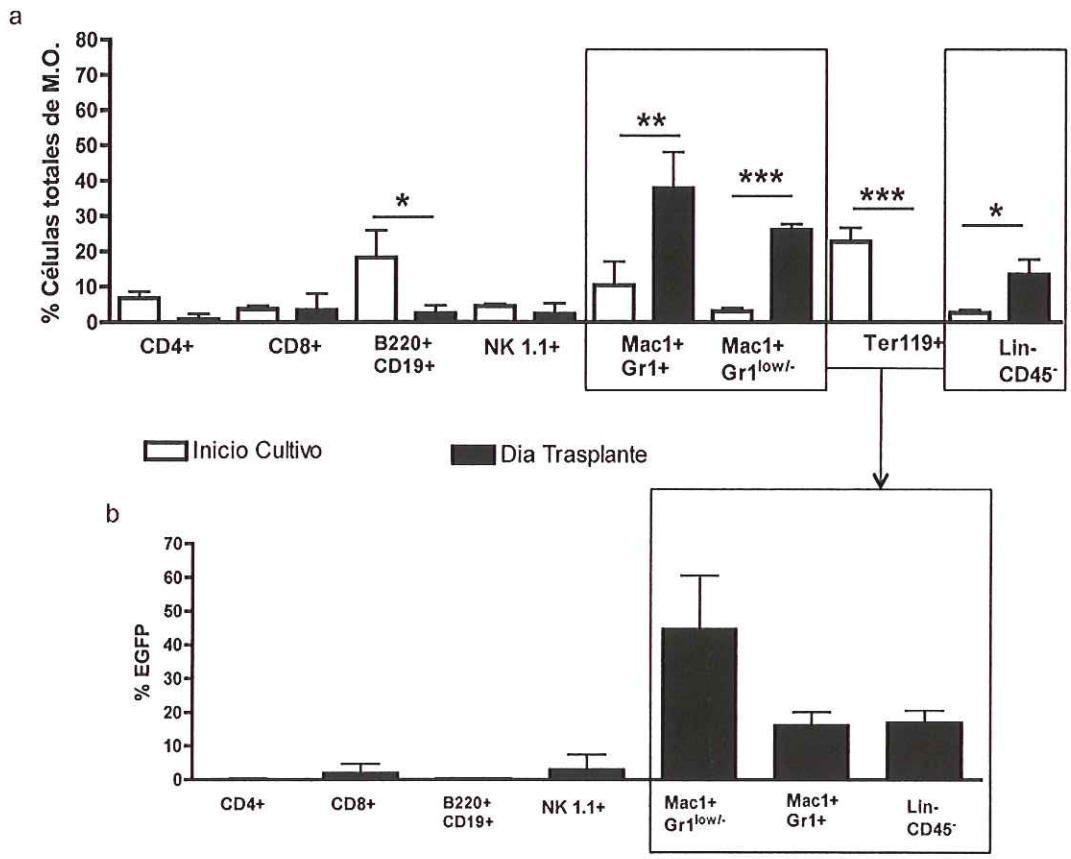

***Figura 5: Análisis del fenotipo de la MO**: a) Representación gráfica del porcentaje de cada población analizada en la MO al inicio y final del cultivo. b) Representación gráfica del fenotipo de la MO transducida.*

2- Análisis fenotípico y funcional de las poblaciones candidatas

Una vez determinado el fenotipo del cultivo se procedió a caracterizar fenotípicamente las tres poblaciones mayoritarias del cultivo de MO.

Se analizo el fenotipo de las dos poblaciones mieloides y de la población que presenta ausencia de marcadores hematopoyéticos. En las dos poblaciones mieloides se analizaron marcadores que caracterizan a las células mieloides supresoras y observamos que la población $CD11b^+$ $Gr\text{-}1^+$ presenta bajos niveles de F4/80 y de CD124 (recetor IL4α) y la población $CD11b^+$ $Gr1^{low}$ también expresa bajos niveles de F4/80 pero los niveles de CD124 son más elevados que en la población $CD11b^+$ $Gr\text{-}1^+$. Estos resultados nos indican que las dos poblaciones presentan un fenotipo compatible con el de MDSC ($CD11b^+$ $Gr1^{low/+}$ $F4/80^{Low}$ $CD124^+$).

Por otro lado se analizaron una serie de marcadores característicos de las células mesenquimales observado que la población con ausencia de marcadores de linaje hematopoyético presentaba marcadores de célula mesenquimal (Lin^- $CD45^-$ $CD29^+$ $CD44^+$ $CD105^+$ $CD90^+$ $MHC\text{-}I^{low}$ $MHC\text{-}II^-$) (figura 6).

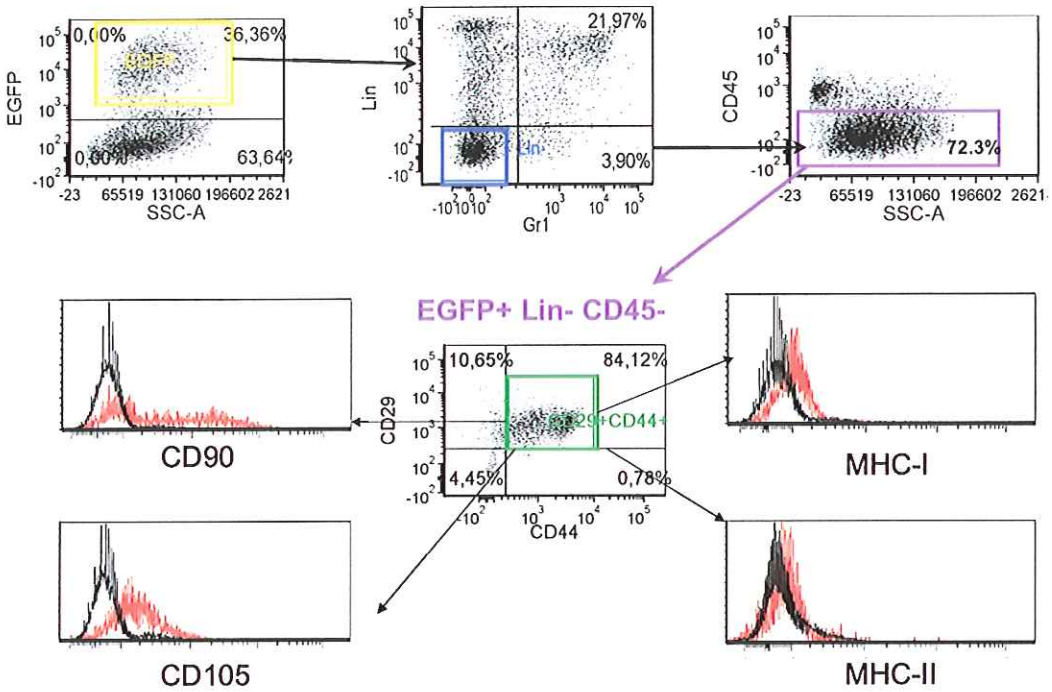

Figura 6- Análisis por citometría del la población no hematopoyética (Lin⁻ CD45⁻) transducida.

Para caracterizar funcionalmente las poblaciones candidatas se hicieron análisis bioquímicos de la actividad arginasa-1 y la producción de NO_2 tanto en la MO no fraccionada como en las poblaciones candidatas purificadas. Observamos que la MO no fraccionada, tras ser activada en cultivo con IFN-γ y LPS, presentaba un aumento de la actividad arginasa (71 ± 30,2 mU arginasa) y producía NO_2 (7,4 ± 5,7 μM NO_2) en comparación con el medio (60,2 ± 30,5 mU arginasa y 1,17 ± 1,03 μM NO_2). Analizando estos mismos marcadores bioquímicos en las tres poblaciones candidatas se observó que la población $CD11b^+$ $Gr\text{-}1^{low}$ tenía niveles significativamente más altos de actividad arginasa y de producción de NO_2 (79,17 ± 17,66 mU arginasa y 10,74 ± 4,356 μM NO_2) en comparación con las otras dos poblaciones, $CD11b^+$ $Gr\text{-}1^+$ (16,35 ± 3,51 mU arginasa y 0,42 ± 0,94 μM NO_2) (p=0,004 y p=0,025 respectivamente) y Lin^- $CD45^-$(30,79 ± 12,5 mU arginasa y 0,81 ± 0,8 μM NO_2) (p=0,040 y p=0,029 respectivamente) (figura 7).

Estos resultados nos indican que las población $CD11b^+$ $Gr\text{-}1^{low}$ es la principal responsable de la producción de NO_2 y del aumento de actividad arginasa observado en la MO total y nos sugieren que esta población sería la máxima candidata a mediar el efecto tolerogénico observado *in vivo*.

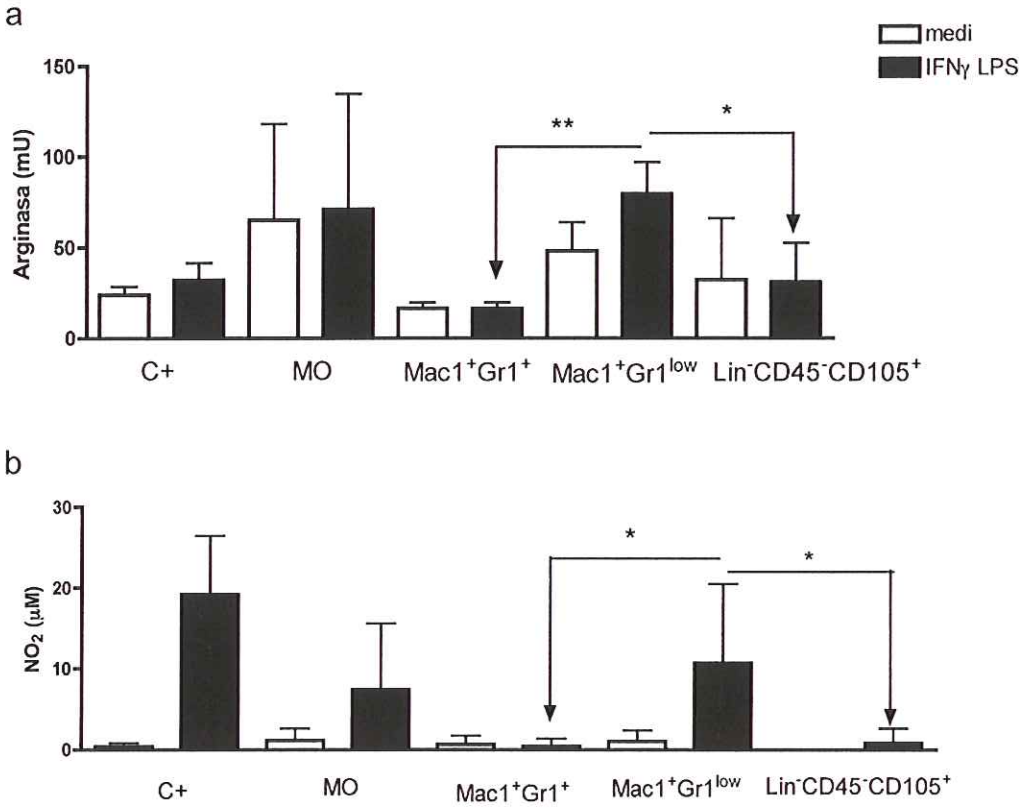

Figura 7: Determinación de los niveles de producción de NO_2 y de la actividad arginasa en MO y en las poblaciones celulares candidatas.

3- Análisis de la capacidad supresora de la MO

Una vez caracterizadas fenotípicamente las poblaciones candidatas procedimos a estudiar la capacidad de suprimir la proliferación de esplenocitos por parte de la MO total y de las tres poblaciones a estudiar. Para ello se cocultivaron esplenocitos de un ratón inmunizado con MOG_{40-55} con células de MO o de las subpoblaciones purificadas, transducidas con el vector terapéutico (IiM) o con el vector control (Ii), y después de 72 h se analizó la proliferación mediante la incorporación de timidina tritiada. Los resultados obtenidos nos muestran que la MO tiene capacidad de suprimir la proliferación de los esplenocitos tanto de forma inespecífica como antígeno-específica y que este efecto es dosis dependiente (figura 8). Creemos que este efecto está mediado principalmente por la población $CD11b^+$ $Gr\text{-}1^{low}$ aunque no se puede descartar la posible contribución ha este efector de la población $CD11b^+$ $Gr\text{-}1^+$

Generalitat de Catalunya
Departament d'Innovació,
Universitats i Empresa

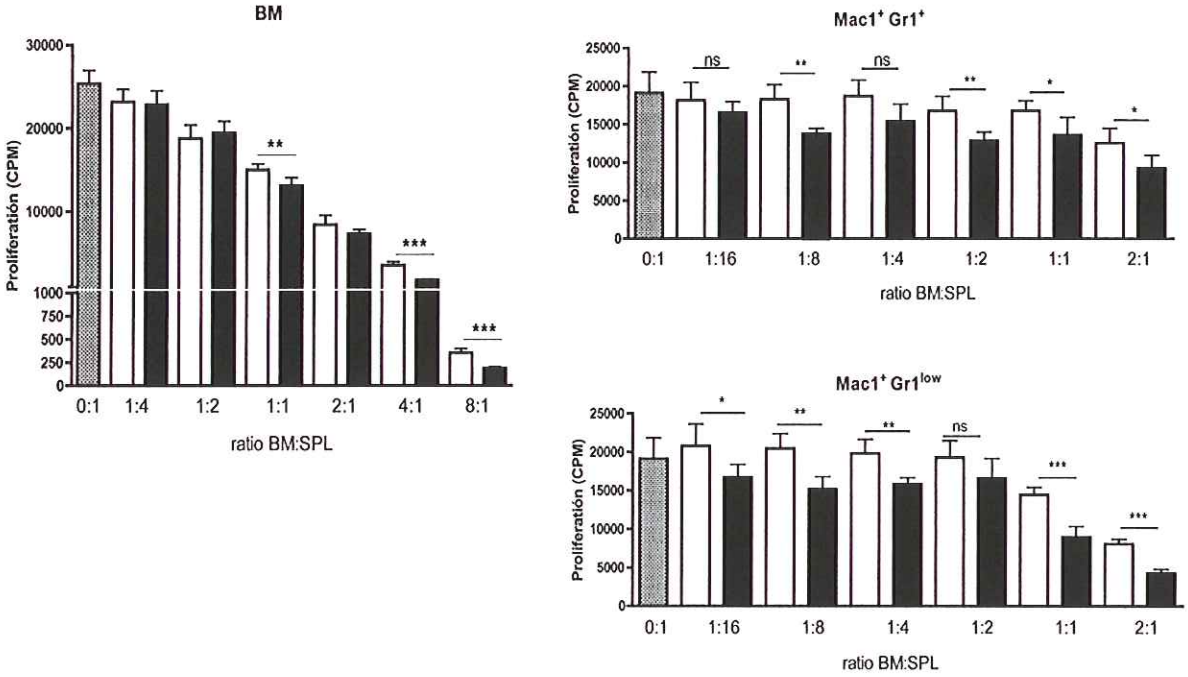

Figura 8: Análisis de la capacidad supresora de la MO y de las subpoblaciones celulares candidatas.

4- Análisis de células T reguladoras naturales (Treg) en animales recuperados de EAE.

A hembras de la cepa de ratón C57BL/6J de ocho semanas de edad se les indujo la EAE y cuando aparecieron los signos clínicos en la mayoría de los animales (día 16-17 p.i.) se distribuyeron en los diferentes grupos experimentales comparables clínicamente. A dos de los grupos se les infundió células de MO transducidas con el vector terapéutico (grupo IiM) o con el vector control (grupo Ii), el tercer grupo se quedó como grupo de control de la enfermedad (grupo EAE).

Se sacrificaron los ratones del grupo IiM cuando presentaron un reversión de los signos clínicos, a lo largo de 7 días consecutivos, descartando así una reversión espontánea de la enfermedad, al mismo tiempo se sacrificaron ratones de cada grupo control.

Se analizó la presencia de células Treg tanto en bazo como en SNC de los ratones de los diferentes grupos.

No se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales en el porcentaje de la población de células T reguladoras naturales, ni en el bazo (IiM: 0,980% ± 0,153, Ii: 1,140% ± 0,370, EAE: 1,927% ± 0,463) ni en el SNC (IiM: 3,225% ± 2,610, Ii: 5,835% ± 4,115, EAE: 3,067 ± 0,561) (figura 9). Estos resultados nos sugieren que la mejora clínica de los ratones no es debida a un aumento de la población reguladora y por lo tanto no estaría implicada en la inducción de tolerancia inmunitaria en nuestro modelo animal, si bien el pequeño tamaño muestral nos impide extraer conclusiones más definitivas.

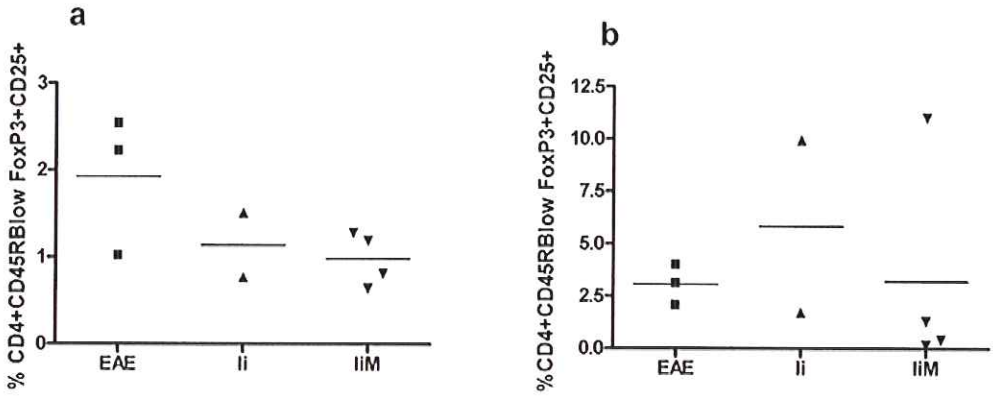

Figura 9: Análisis de la población T reguladora natural. *Los gráficos representan el porcentaje de la población CD45RB^{low} FoxP3^{+} CD25^{+} dentro de la población CD4^{+} analizado en bazo (a) y SNC (b) solo de los ratones recuperados (IiM) y de los controles (Ii y EAE).*

5- Análisis de las células T reguladoras inducidas (Tr1) en ratones recuperados.

Al mismo tiempo que se realizó el análisis de la células Treg, se cultivaron 2x10^{5} células CD4^{+}, procedentes del bazo de los ratones, en presencia de estímulos inespecíficos (PMA + ionomicina) con el propósito de activar la proliferación celular y la secreción de citocinas. Después de 6 h en cultivo se realizó un marcaje de superficie (CD4 y CD45RB) y de citocinas intracelulares (IL10, IL4 e IL17) para analizar la población Tr1 (CD4^{+} CD45RB^{low} IL10^{hi} IL4^{-} IL17^{low}).

Tal y como de observa en la tabla 7 no se observan diferencias significativas en los niveles de expresión de citocinas entre los diferentes grupos, sugiriendo que la mejora de los signos clínicos en el grupo IiM no es debida a una activación de las células Tr1 por parte de las células de MO que se han infundido a estos ratones ya que si hubiera sido así habríamos observado un aumento de la secreción de IL-10 y una disminución de IL-4 en el grupo IiM en comparación con los otros dos grupos experimentales, si bien, como comentamos en el anterior apartado, el reducido tamaño muestral impide extraer conclusiones más definitivas.

Tabla 7: Porcentaje de citocinas intracelulares.

	EAE	Ii	IiM
IL-10	5,083% ± 0,706	5,890% ± 0,450	4,513% ± 0,194
IL-4	0,467% ± 0.0353	0,400% ± ,090	0,418% ± 0,0788
IL-17	0,137% ± 0,012	0,185% ± 0,015	0,155% ± 0,047

Discusión

La finalidad de este trabajo es estudiar los mecanismos implicados en la inducción de tolerancia inmunitaria en el modelo murino de EAE después de la infusión de células de MO que expresan un autoantígeno. Para ello se estudio, en primer lugar, el fenotipo de la MO transducida con vectores retrovirales. Sabiendo gracias a estudios previos por parte de nuestro grupo, que el efecto tolerogénico es antígeno específico (pues no se produce en los grupos control), analizando la población de células transducidas observamos que habían tres subpoblaciones, definidas fenotípicamente, que eran mayoritarias al final de cultivo, dos de ellas con fenotipo mieloide ($CD11b^+$ $Gr1^{low}$ y $CD11b^+$ $Gr1^+$) y una tercera con fenotipo mesenquimal. Debido al bajo rendimiento de recuperación en la purificación de la población mesenquimal, los estudios del efecto tolerogénico *in vitro* se centró en las dos poblaciones mieloides. Según los resultados obtenidos podemos decir que la mejor candidata a inducir tolerancia en el modelo de EAE es la $CD11b^+$ $Gr\text{-}1^{low}$ ya que es la que tiene un efecto supresor más marcado y la única que tiene expresión de NO sintetasa y aumento de la expresión de arginasa-1 cuando es activada con LPS y IFN-γ. Estos datos nos indicarían que se podría tratar de una población previamente descrita como MDSC. Además, los resultados obtenidos nos sugieren que el efecto supresor podría estar mediado por este aumento en la expresión de arginasa-1 y NO sintetasa, ya que son los mecanismos descritos por los que las MDSC suprimen la respuesta T (Gabrilovich and Nagaraj 2009).

Por otro lado, se estudió la participación de las dos población de células T reguladoras (Treg y Tr1) en la inducción de tolerancia en este modelo. Para ello se analizó la presencia de dichas células en bazo y SNC de ratones con EAE pocos días después del inició de la recuperación de los signos clínicos en los ratones (IiM) para poder encontrar la máxima concentración de estos tipos celulares en los tejidos linfoides (bazo y ganglios) y en el lugar de inflamación (SNC). Una vez analizadas las dos poblaciones de células T reguladoras se observó que el porcentaje de estas poblaciones no estaba aumentado ni en el bazo ni en el SNC de los ratones recuperados, sino que tenían niveles muy parecidos a los del grupo no tratado (EAE) o al grupo tratado con el vector control (Ii), indicándonos que la mejora observada en los animales no es debida a una activación de células Treg y su migración al lugar de inflamación (SNC). Tampoco se ha observado un aumento de la población Tr1 ya que los niveles de citocinas intracelular (IL-10, IL-4, IL-17) eran similares comparando los diferentes grupos experimentales. Con todo, no podemos descartar que participen en el mantenimiento de la tolerancia a largo plazo, ya que los altos niveles de IL-10 y IL5 observados previamente se habían detectado 41 días después de inducir la EAE en los ratones.

Como consecuencia de estos resultados pensamos que la recuperación inicial de los ratones podría estar mediada por la población $CD11b^+$ $Gr\text{-}1^{low}$, ya que tienen un efecto inmunosupresor antígeno específico *in vitro* significativamente más marcado que el resto de poblaciones candidatas ($CD11b^+$ $Gr\text{-}1^+$ y mesenquimales). Esta actividad supresora podría activar secundariamente a células Treg que se encargarían de mantener la tolerancia inmunitaria en los ratones recuperados (Huang et al. 2006).

Bibliografia

Bacchetta, R., et al. (2005). "CD4+ regulatory T cells: mechanisms of induction and effector function." Autoimmun Rev **4**(8): 491-6.

Battaglia, M., et al. (2006). "Induction of tolerance in type 1 diabetes via both CD4+CD25+ T regulatory cells and T regulatory type 1 cells." Diabetes **55**(6): 1571-80.

Corraliza, I. M., et al. (1994). "Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod." J Immunol Methods **174**(1-2): 231-5.

Ding, A. H., et al. (1988). "Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production." J Immunol **141**(7): 2407-12.

Dugast, A. S. and B. Vanhove (2009). "Immune regulation by non-lymphoid cells in transplantation." Clin Exp Immunol **156**(1): 25-34.

Eixarch, H., et al. (2009). "Tolerance induction in experimental autoimmune encephalomyelitis using non-myeloablative hematopoietic gene therapy with autoantigen." Mol Ther **17**(5): 897-905.

Gabrilovich, D. I. and S. Nagaraj (2009). "Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system." Nat Rev Immunol **9**(3): 162-74.

Hildinger, M., et al. (1999). "Bicistronic retroviral vectors for combining myeloprotection with cell-surface marking." Gene Ther **6**(7): 1222-30.

Huang, B., et al. (2006). "Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host." Cancer Res **66**(2): 1123-31.

Martinez-Forero, I., et al. (2008). "IL-10 suppressor activity and ex vivo Tr1 cell function are impaired in multiple sclerosis." Eur J Immunol **38**(2): 576-86.

Morecki, S., et al. (2008). "CpG-induced myeloid CD11b+Gr-1+ cells efficiently suppress T cell-mediated immunoreactivity and graft-versus-host disease in a murine model of allogeneic cell therapy." Biol Blood Marrow Transplant **14**(9): 973-84.

Wakkach, A., et al. (2003). "Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo." Immunity **18**(5): 605-17.

Youn, J. I., et al. (2008). "Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice." J Immunol **181**(8): 5791-802.