



UNIVERSITAT DE BARCELONA



FACULTAT DE FARMÀCIA

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

**Estudios sobre la inducción de tolerancia
inmunológica mediante la expresión de
antígenos en células hematopoyéticas murinas.
Aplicación a un modelo experimental de
enfermedad autoinmune.**

Herena Eixarch Ahufinger
2008

MATERIAL Y MÉTODOS

1- CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES RETROVIRALES

Los vectores retrovirales empleados en este trabajo se generaron a partir del vector retroviral SF91-IRES-EGFP (cedido por Christopher Baum, Hannover, Alemania) (Hildinger et al. 1999) basado en el virus MoMuLV. Esta familia de vectores retrovirales, a la que también pertenece el vector SF1-EGFP, está optimizada para una expresión elevada de transgenes en progenitores hematopoyéticos mieloides.

Se generaron dos vectores retrovirales que contenían la secuencia codificante para la li murina salvaje (vector control) o la li murina con la secuencia que codifica para la región CLIP substituida por la que codifica para el péptido MOG₄₀₋₅₅. El cADN de la li murina se obtuvo de la línea celular EL4 (procedente de un linfoma T murino y amablemente cedida por Joaquín Teixidó, CIB, Madrid) y de la que ya se sabía que era capaz de presentar antígenos por la vía de clase II. Se extrajo el ARN total de dicha línea celular usando el *QiaAmp RNA Blood Mini kit* (Qiagen) y siguiendo el protocolo del fabricante. Los dos fragmentos de la li que flanquean la región CLIP fueron amplificados por RT-PCR (*SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum Taq*, Invitrogen) con el siguiente programa:

- 50°C – 30'
- 94°C – 3'
- 94°C – 20" } 40 ciclos
- 56°C – 30" }
- 72°C – 30" }
- 72°C – 3'

Se utilizaron un par de *primers* o cebadores para la amplificación de cada fragmento, a los que se les modificó la secuencia para añadir una diana de restricción adecuada (secuencia subrayada) que facilitara el posterior clonaje de los fragmentos. Los *primers* usados para amplificar el fragmento 5' fueron: li-1 (5'TAGAGTCTAGAGCCAT GGATGACC-3', introducción de una diana para la enzima de restricción *Xba*I) y li-2 (5'-CCATCCATCGATAGCTCACAGGTTTGC-3', introducción de una diana para la enzima de restricción *Cl*aI). Para generar el fragmento 3' se usó el par de *primers* li-3 (5'-TACTCGCAATGGCAAGCGTCCAATGTCCAG-3', introducción de una diana para la enzima de restricción *B*srDI) y li-4 (5'-GAAGGGCTGCAGCACAGGAGAGC-3', introducción de una diana para la enzima de restricción *P*stI). Todos los *primers* mencionados en este apartado fueron sintetizados por Invitrogen.

Los dos oligonucleótidos, también sintetizados por Invitrogen, que codifican para el péptido MOG₄₀₋₅₅ (MOG-I 5'-CGATCTCCCTTCTCAAGAGTGGTTCACCTCTACCGCAATGGC-3' y MOG-II 5'-CATTGCGGTAGAGGTGAACCACTCTTGAGAAGGGAGAT-3') se hibridaron siguiendo el siguiente protocolo:

1. Preparar la siguiente mezcla de reacción en un tubo de 0,2 ml (en un volumen final de 25 µl):
 - Oligonucleótidos a 50 ng/ml 6 µl
 - MgCl₂ 50 mM 0,75 µl
 - Tampón 10x Taq Platinum (Invitrogen) 2,5 µl
 - H₂O 15,75 µl
2. Poner el tubo en el termociclador con el siguiente programa:
 - 5' a 90°C
 - 10' a 70°C
 - 10' a 45°C
 - 10' a 37°C
 - 10' a 30°C

El producto de la hibridación da lugar a una secuencia sintética de ADN que codifica para el péptido MOG₄₀₋₅₅, con extremos cohesivos (*Cla*I, *Pst*I) para facilitar su clonaje (Fig. 15a). Paralelamente, los fragmentos 5' y 3' (li5' y li3') se digirieron con las enzimas de restricción *Xba*I y *Cla*I, o *Pst*I y *Bsr*DI respectivamente. La secuencia codificante para MOG₄₀₋₅₅ y el fragmento 3' se clonaron en el vector de clonaje BlueScript SK- (BS SK-) previamente digerido con las enzimas de restricción *Pst*I y *Cla*I con las técnicas habituales de ligación. El inserto MOG-li3' se extrajo del vector de clonaje por PCR usando el siguiente programa de amplificación:

- 94°C – 3'
- 94°C – 20" } 34 ciclos
- 50°C – 30" }
- 72°C – 1' }
- 72°C – 3'

Posteriormente se digirió con *Pst*I y *Cla*I y se insertó en el vector BS SK- (previamente digerido con las enzimas de restricción *Xba*I y *Pst*I) junto al fragmento li5' para finalmente obtener el vector denominado BS-liMOG (Fig. 15a), que contenía la secuencia codificante para la li murina con la región CLIP reemplazada por la secuencia del péptido MOG₄₀₋₅₅.

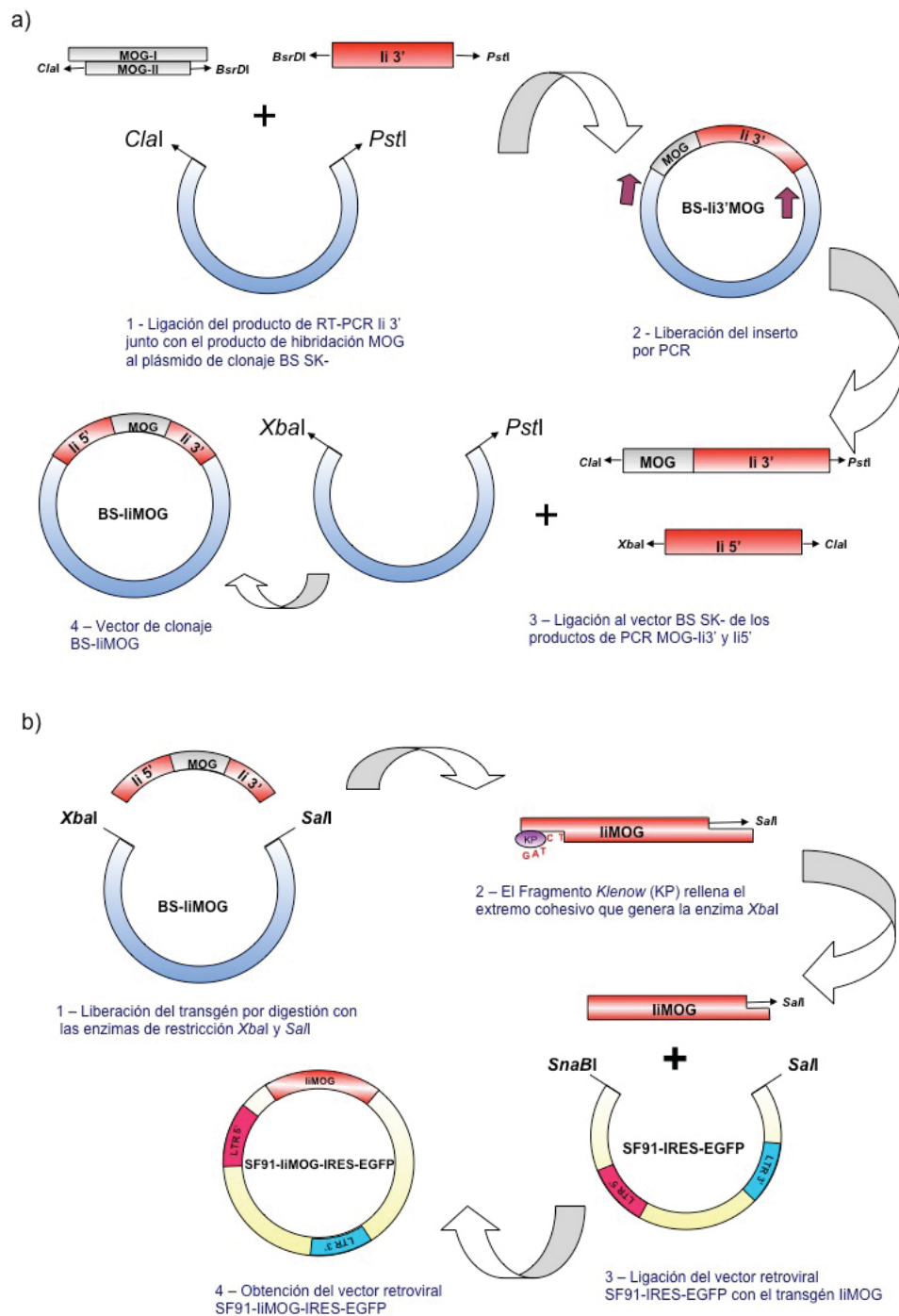


Fig. 15- Proceso de obtención del vector de clonaje BS-liMOG y del vector retroviral SF91-liMOG-IRES-EGFP. a) Se obtuvieron los fragmentos flanqueantes de la región CLIP de la li murina por RT-PCR. El par de oligonucleótidos hibridados que codifican para el péptido MOG₄₀₋₅₅ y el fragmento 3' de la li se clonaron en el vector BS SK- para posteriormente liberar el fragmento li3'MOG y clonarlo junto con el fragmento 5' de la li en el vector BS SK-, generando finalmente el vector BS-liMOG. b) El transgén liMOG se liberó por digestión con las enzimas de restricción *XbaI* y *SalI*. El extremo cohesivo dejado por *XbaI* se rellenoó usando el Fragmento *Klenow*. Posteriormente se clonó el transgén en el vector retroviral SF91-IRES-EGFP previamente digerido con las enzimas de restricción *SnaBI* (digiere el ADN dejando el extremo romo) y *SalI*.

Esta secuencia se liberó del vector de clonaje por digestión con *Xba*I y *Pst*I. El extremo *Xba*I se rellenó con el Fragmento *Klenow* (New England Biolabs) para generar un extremo 5' romo, y posteriormente se insertó en el vector retroviral SF91-IRES-EGFP (Fig. 15b). Este vector fue denominado SF91-liMOG-IRES-EGFP.

Por otro lado, el cADN de la li murina se amplificó a partir del mismo ARN con el mismo programa descrito en este apartado usando el par de *primers* li1 y li4. El producto de la RT-PCR fue digerido con las enzimas de restricción *Xba*I y *Pst*I y posteriormente clonado en el vector BS SK-. Una vez liberado el inserto por digestión con *Xba*I y *Sal*I, el extremo *Xba*I fue rellenado con el Fragmento *Klenow*, y finalmente insertado en el vector retroviral SF91-IRES-EGFP previamente digerido con *Sna*BI y *Sal*I, dando lugar al vector control denominado SF91-li-IRES-EGFP. El vector SF1-EGFP había sido generado anteriormente en nuestro laboratorio (Limon et al. 1997). En la Figura 16 se esquematizan los vectores retrovirales usados en los trabajos que se presentan en esta tesis.

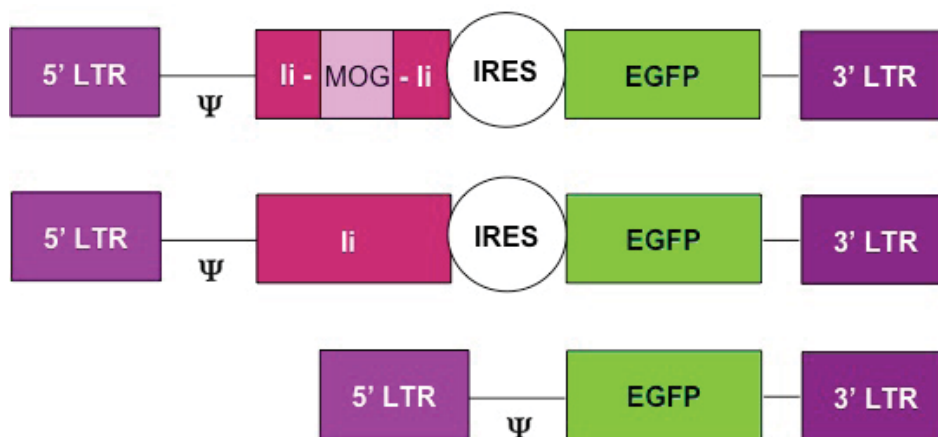


Fig. 16- Esquema de los vectores retrovirales usados. El primer esquema corresponde al vector SF91-liMOG-IRES-EGFP, que expresa la li murina con el autoantígeno MOG₄₀₋₅₅ reemplazando la región CLIP, además de la EGFP. Los otros dos vectores (SF91-li-IRES-EGFP y SF1-EGFP respectivamente) se usaron como controles en los diferentes experimentos.

2- OBTENCIÓN DE LÍNEAS CELULARES PRODUCTORAS DE VECTORES RETROVIRALES

La línea empaquetadora NX-ecotrópica (derivada de la línea 293 de riñón embrionario humano y cedida por G. P. Nolan, Universidad de Stanford, CA, EUA) expresa de forma estable dos plásmidos, el primero de ellos codifica para la glicoproteína

ecotrópica de la envuelta del retrovirus (codificada en el gen *env*), con tropismo para células murinas, y el segundo codifica tanto para el resto de proteínas estructurales del virus para poder formar nuevos viriones (codificadas en el gen *gag*) como para las enzimas necesarias para el ciclo vital del virus (codificadas en el gen *pol*). Fue transfectada con los dos vectores retrovirales (SF91-IIMOG-IRES-EGFP y SF-Ii-IRES-EGFP) usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) según las recomendaciones del fabricante. El sobrenadante resultante se usó para transducir la línea empaquetadora PG13 (seudotipada con el gen *env* de GALV, con tropismo para células de primates y perro), y el sobrenadante de ésta se usó para transducir las células NX-ecotrópicas. Este proceso, denominado “*ping pong*”, permite enriquecer la población de células que expresan el vector retroviral de forma estable. A continuación se realizó una separación de células EGFP⁺ individuales mediante el dispositivo de autoclón del citómetro FACS Aria (Becton-Dickinson). Las células individuales o clones se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos (TPP™) en 100 µl del medio descrito a continuación:

- 50 µl de medio DMEM (PAA) suplementado con:
 - 10% de suero bovino fetal (FCS) Gold (PAA)
 - 2 mM de L-glutamina (PAA)
 - 50 UI/ml de penicilina (PAA)
 - 50 µg/ml de estreptomina (PAA)
- 50 µl de medio condicionado, obtenido del cultivo donde crecían las células antes de ser separadas, filtrado a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm de diámetro de poro (Nalgene) para permitir el paso de los vectores retrovirales (80-120 nm de diámetro) pero no el de las células.

Las células se cultivaron en un incubador a 37°C, 5% CO₂ y 100% de humedad relativa hasta que se observó por microscopía óptica el crecimiento de clones (a partir de la segunda semana). Tras inspección visual mediante microscopía de fluorescencia, los clones que no expresaban el gen marcador EGFP se descartaron. En aquellos que sí lo expresaban y por lo tanto tenían el vector retroviral incorporado en su genoma, se analizó la producción de vectores siguiendo el siguiente protocolo:

1. *Día 0*: Sembrar las células diana (NIH/3T3, fibroblastos de ratón) a una densidad de 50000 células por ml en placas de 6 pocillos (Nalgene Nunc™ International) en un volumen final de 2 ml de medio DMEM suplementado con:
 - 10% de FCS Gold

- 2 mM de L-glutamina
- 50 UI/ml de penicilina
- 50 µg/ml de estreptomina

Sembrar células productoras en un frasco de cultivo T25 (Nalgene Nunc™ International) y en medio fresco a la densidad adecuada para que a las 16-18 horas estén al 80-100% de confluencia.

2. *Día 1:* Recoger el sobrenadante de las células productoras y filtrarlo a través de un filtro de 0,45 µm.

Reemplazar $\frac{3}{4}$ partes del medio del cultivo de las células diana por una mezcla de medio fresco y 200 µl de sobrenadante de las células productoras a probar. Añadir a cada pocillo 4 µg/ml de sulfato de protamina (Rovi S.A.).

Centrifugar las placas durante 1 hora a 652 g y a 32°C.

Mantener los cultivos celulares en un incubador a 37°C, 5% CO₂ y 100% de humedad.

3. *Día 3:* Analizar la eficiencia de transducción por citometría de flujo (FACSCalibur, Becton-Dickinson).

Se eligió el clon de células productoras cuyo sobrenadante resultó en una mayor eficiencia de transducción para cada uno de los vectores y fueron denominados NX-e/liMOG23 y NX-e/li7. Se realizó una amplificación de dichos clones y se criopreservaron en alícuotas siguiendo el protocolo habitual de congelación de líneas celulares. La línea productora del vector SF1-EGFP, denominada NX-e/EGFP16, había sido generada anteriormente en nuestro laboratorio (Puig et al. 2002).

3- TITULACIÓN DE LAS LÍNEAS PRODUCTORAS NX-E/liMOG23 Y NX-E/li7

Para determinar el título viral absoluto de las líneas productoras ecotrópicas se infectaron células diana NIH/3T3 tal y como se especifica en el apartado anterior, con la diferencia que se usaron volúmenes crecientes del sobrenadante retroviral (10, 25, 50, 100, 200, 300, 500, y 800 µl) y se hicieron duplicados de cada volumen a analizar. A las 48 horas se determinó el porcentaje de células diana con fluorescencia verde mediante citometría de flujo para cada uno de los volúmenes utilizados. El título viral se estimó mediante el siguiente cálculo:

$$\text{Título viral} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de células diana (día 0)} \times \% \text{ células fluorescentes}}{\text{Volumen de sobrenadante (ml)}}$$

Con los resultados obtenidos con los diferentes volúmenes de sobrenadante empleados se obtuvo una curva sigmoidea. Los valores más precisos del título viral se obtienen de la parte más exponencial o más sensible de dicha curva, y se expresa en partículas infecciosas/ml (PI/ml).

4- TRANSDUCCIÓN Y TRASPLANTE HEMATOPOYÉTICO

4.1- Ratones

Como ratones donantes de MO se utilizaron hembras de entre 6 y 10 semanas de edad de la cepa B6/SJL-*Ptprc^aPep3^b*/BoyJ (Jackson Laboratories; en adelante se referirá a esta cepa como B6/SJL), criadas y mantenidas en el estabulario del *Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron*. Se estabularon en salas con temperatura controlada (20-22°C) 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 entre 6 y 10 semanas de la cepa congénica C57BL/6J (Harlan). A su llegada, se distribuyeron en grupos de 5 ó 6 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.

4.2- Obtención de células de MO

A los ratones donantes se les administró intraperitonealmente (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 17. 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 CO₂. 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 estreptomina

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).

4.3- Transducción de células de MO

4.3.1- 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).

4.3.2- 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 μ g/ml de estreptomicina
- 10% de medio condicionado de la línea celular WEHI 3B⁺, fuente de IL-3 murina (Lee et al. 1982)
- 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 37°C, 5% CO₂ y 100% de humedad relativa con la finalidad de estimular a las células progenitoras a dividirse y evitar su apoptosis.

4.3.3- Obtención del sobrenadante rico en retrovirus recombinantes

Los clones de células productoras de retrovirus recombinantes NX-e/liMOG23, NX-e/li7 y NX-e/EGFP16 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 4.3.2, 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 -80°C hasta que hubo necesidad de utilizarlos.

4.3.4- 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. 17). Se recogió el 90% del volumen de medio de cada pocillo en un tubo de 50 ml y se centrifugó a 453 g a 4°C. El *pellet* celular se resuspendió en la siguiente mezcla:

- 10% medio condicionado WEHI
- 8% medio condicionado BHK/MKL
- 4 µg/ml de sulfato de protamina
- 82% 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 1 hora a 32°C. Al día siguiente se repitió este mismo procedimiento.

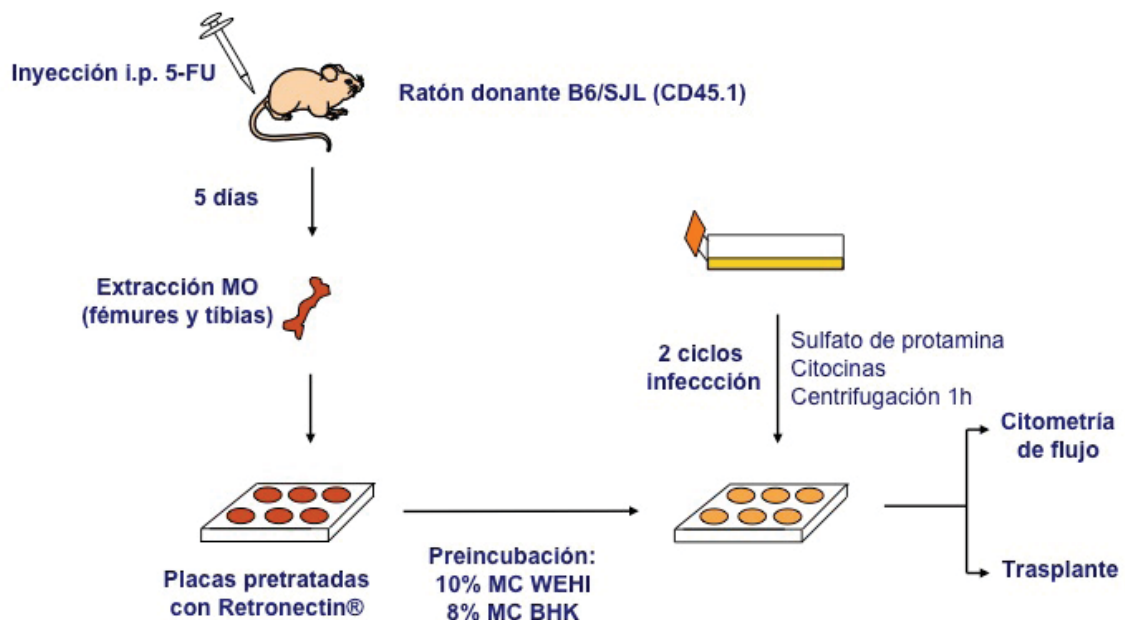


Fig. 17- Esquema de la obtención y transducción de la MO murina. Ver texto.
5-FU: 5-fluorouracilo; i.p: intraperitoneal; MC: medio condicionado.

4.4- Secuenciación de las construcciones liMOG e li a partir de ADN genómico de MO transducida

Se transdujeron las células de MO tal y como se describe en el apartado 4.3. Posteriormente se procedió a extraer el ADN utilizando el kit *FlexiGene DNA* (Qiagen) según el protocolo del fabricante. Se realizó una PCR con los *primers* 5'-TAAGTAATAGTCCCTCTCTCCAAGCTC-3' (*primer* 249F) y 5'-CGGCTTCGGCCAGTAA CG-3' (*primer* 249R), que se encuentran situados a 5' del transgén y del inicio de la región IRES del vector respectivamente (Fig. 18), con el programa de amplificación descrito en el apartado 1. Una vez obtenido el producto de amplificación se siguió el siguiente protocolo de secuenciación:

1. Purificación del producto de amplificación:

Añadir 2 µl de *ExoSAP-IT* (USB) por cada 8 µl de producto de amplificación

Poner la placa en el termociclador con el siguiente programa:

- 37°C – 15'
- 80°C – 15'

2. Reacción de secuencia:

Mezclar en cada pocillo:

- 1 µl de *Big Dye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Reaction Kit* (Applied BioSystems)
- 2,8 µl de producto de amplificación a 30-50 ng/µl
- 0,5 µl de *primer* 249F o de *primer* 249R

Poner la placa en el termociclador con el siguiente programa:

- 94° C – 3'
 - 96° C – 10''
 - 50° C – 5''
 - 60° C – 4'
- } 25 ciclos

3. Precipitación de las reacciones de secuencia:

- Preparar la mezcla de precipitación (cantidades para 1 muestra):

50 µl etanol absoluto

23 µl H₂O destilada

2 µl NaAc 3 M

- Incubar 15' a temperatura ambiente
- Centrifugar 15' a 1400 g y eliminar el sobrenadante
- Eliminar los restos del sobrenadante centrifugando 2' a 1400 g
- Resuspender en 20 µl de formamida desionizada HiDi

- Dejar resuspender 10' a temperatura ambiente
- Desnaturalizar en el termociclador 3' a 94° C
- Incubar en hielo 5'
- Realizar la electroforesis capilar utilizando el secuenciador *ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer*

Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa *Sequencing Analysis 1.1.1* (Applied BioSystems).

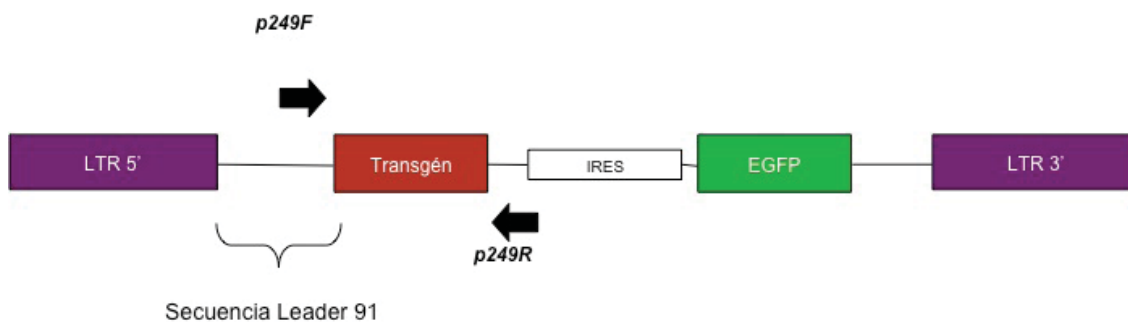


Fig. 18- Situación de los *primers* (representados por las flechas) usados para amplificar y secuenciar los transgenes liMOG e li en ADN genómico de células de MO transducidas con ambos vectores. EGFP: proteína verde fluorescente; IRES: sitio interno de entrada del ribosoma; LTR: secuencias repetitivas largas del los extremos.

4.5- Trasplante de células de MO transducida

4.5.1- Acondicionamiento de los ratones receptores

Los ratones receptores del trasplante de MO transducida se acondicionaron, alternativamente, con dos regímenes de acondicionamiento distintos. En la mayoría de experimentos se usaron dos dosis de 20 mg/kg de busulfán (Sigma Chemical CO) diluido en 5% de DMSO (Sigma Chemical CO) y 95% de suero fisiológico los días 3 y 2 previos al trasplante, por vía i.p. En los experimentos en los que se quiso comparar el busulfán con la ICT, los receptores recibieron, 1 día antes del trasplante, 3-4 Gy de ICT a una tasa de dosis de 2,35 Gy/minuto con una fuente de ^{137}Cs . Se usó el irradiador CisBio International IBL 437C. La dosis que se les administró en los dos regímenes fue subletal y parcialmente mieloablativa. El proceso del trasplante de MO se representa gráficamente en la Figura 19.

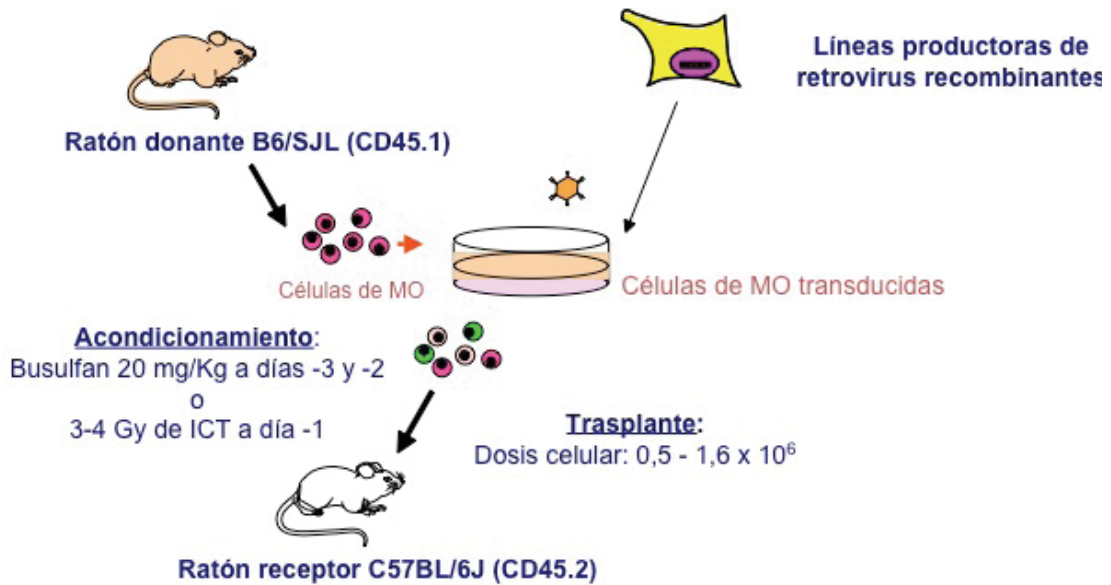


Fig. 19- Esquema del trasplante de células transducidas de MO. Las células de MO del donante transducidas se trasplantaron a ratones receptores previamente acondicionados.

4.5.2- Trasplante 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 minutos 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 entre 0,5 y $1,6 \times 10^6$ CMN por ratón en un volumen de 200 μ l.

4.5.3- Seguimiento del trasplante

El injerto hematopoyético (porcentaje de células CD45 del donante [CD45.1⁺]) y el quimerismo molecular (porcentaje de células CD45.1⁺ expresando EGFP respecto al total de células CD45⁺) se evaluaron tanto en sangre periférica (SP) como en tejidos hematopoyéticos (timo, bazo y MO) como mínimo 3 semanas después del trasplante y, en algunos casos, hasta 3 meses después del mismo. La SP se obtuvo de la vena safena en el caso de que los ratones se tuvieran que mantener con vida, o por punción cardíaca en el momento del sacrificio. Las células se marcaron con anticuerpos

monoclonales conjugados a fluorocromos, según se describe en los apartados 9.1.1 y 9.3, y se analizaron por citometría de flujo.

5- INDUCCIÓN DE LA EAE Y SEGUIMIENTO CLÍNICO

5.1- Inducción de la EAE en el modelo no remitente

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 del péptido MOG₄₀₋₅₅ (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 (Difco Laboratories). 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 48 horas 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 el péptido encefalitogénico. Todos los animales se pesaron y examinaron diariamente para evaluar la presencia y gravedad de los signos clínicos según la siguiente escala (Espejo et al. 2001):

- 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 - Paraplejía trasera
- 4 - Tetraparesia
- 5 - Tetraplejía
- 6 - Muerte por EAE

5.2- Inducción de la EAE en el modelo remitente-recurrente

Se inmunizaron hembras de entre 6 y 8 semanas de edad de la cepa SJL/J (Janvier) tal y como se especifica en el apartado anterior. Se indujo la EAE con 50 µg del péptido 139-151 de la PLP. El mismo día de la inyección y a las 48 horas se les administró por vía i.v. 200 ng de Tp.

6- EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA MIELOABLACIÓN PARCIAL EN EL MODELO REMITENTE-RECURRENTE DE LA EAE

6.1- Irradiación

Los ratones se irradiaron 1 mes antes de la inmunización o 16 días después de la inducción de la enfermedad con 4 Gy tal y como se describe en el apartado 4.5.1.

6.2- Agentes quimioterápicos

Para evaluar el efecto de diferentes agentes quimioterápicos usados en la clínica en regímenes de acondicionamiento, 20 días antes de inducir la EAE se administró a los ratones dos dosis consecutivas de 20 mg/kg de busulfán o tres dosis consecutivas de 1000 mg/kg de treosulfán (Ovastat), que fue amablemente cedido por Medac Ltd. Además, se trató a un grupo de ratones 15 días después de la inducción de la enfermedad con dos dosis de 20 mg/kg de busulfán en días consecutivos.

7. OBTENCIÓN DE CÉLULAS Y TEJIDOS A ESTUDIAR

7.1- Sacrificio y perfusión de los ratones

Los ratones se anestesiaron con 37 mg/kg de ketamina y 5,5 mg/kg de xilacina. Se realizó una laparatomía abdominal que permitía la extracción de los tejidos de interés (bazo, timo, ganglios linfáticos y MO), intentando no lesionar ningún vaso sanguíneo, y se conservaron en medio suplementado con suero y en hielo hasta el momento de su procesamiento. Seguidamente los ratones se perfundieron mediante infusión intracardiaca de PBS en primer lugar y finalmente paraformaldehído al 4% con una bomba de infusión automática a una velocidad de 540 ml/hora.

7.2- Obtención y fijación del SNC

Tras perfundir a los animales, se les extrajo el cerebro y la médula espinal, que se mantuvieron en paraformaldehído al 4% durante una semana a 4°C. Posteriormente se lavaron con PBS y se mantuvieron en una solución de sacarosa al 30% pH 7,2-7,4 (como crioprotector) a 4°C hasta que el cerebro se hundía al fondo del tubo, indicativo que había absorbido la sacarosa necesaria. Finalmente, los tejidos se incluyeron en

Tissue-Tek (Sakura Finetek) y se conservaron a -80°C o se incluyeron en parafina hasta el momento de su análisis.

7.3- Histopatología del SNC

Las tinciones y los marcajes inmunohistoquímicos de los cortes histológicos del SNC fueron realizados y analizados por Alexander Mildner, del grupo de Marco Prinz en el Instituto de Neuropatología de la Universidad *Georg August* (Göttingen, Alemania). Se realizó una tinción con hematoxilina y eosina o *luxol fast blue* (LFB) para observar los infiltrados inflamatorios y la desmielinización respectivamente. Además se realizaron los siguientes marcajes inmunohistoquímicos (Tabla 3) (Prinz et al. 2006; van Loo et al. 2006):

Tabla 3- Tinciones realizadas para cuantificar los parámetros histopatológicos

Tinción	Parámetro que cuantifica	Casa comercial
Anti-Mac3	Microglía/macrófagos	BD Pharmingen
Anti-CD3	Linfocitos T	Serotec
Anti-B220	Linfocitos B	Chemicon
Anti-APP	Daño axonal agudo	Chemicon
Anti-SMI-32	Degeneración funcional de los axones	Sternberg

APP: proteína precursora amiloide; SMI-32: marcador de neurofilamentos defosforilados.

8- ENSAYOS INMUNOLÓGICOS

8.1- Cultivos de esplenocitos para cuantificar la producción de citocinas

Se sembraron esplenocitos de los ratones en medio RPMI 1640 (PAA) suplementado con:

- 10% FCS Gold
- 2 mM de L-glutamina
- 50 UI/ml de penicilina
- 50 µg/ml de estreptomycin
- 50 µM de 2-mercaptoetanol (Sigma Chemical CO)
- 5 µg/ml del péptido MOG₄₀₋₅₅.

Las células se cultivaron a una concentración de 10^6 CMN por ml en un volumen final de 200 μ l. Se mantuvieron en cultivo a 37°C, 5% CO₂ y 100% humedad. Como controles se sembraron esplenocitos cultivados en ausencia del péptido (control negativo) o en presencia de 5 μ g/ml de fitohemaglutinina (PHA; Sigma Chemical, CO.) como control positivo. A las 72 horas se extrajeron 50 μ l del sobrenadante para cuantificar las citocinas por citometría de flujo.

8.2- ELISPOT para detectar la producción de IFN- γ

8.2.1- Cuantificación de la frecuencia de células productoras de IFN- γ específicas para MOG₄₀₋₅₅

Se utilizó el kit *IFN- γ ELISPOTPLUS* (Mabtech) para determinar el número de células T específicas frente a MOG₄₀₋₅₅ productoras de IFN- γ . Las placas pretratadas con el anticuerpo de captura anti-IFN- γ de ratón (clon AN18) se lavaron cuatro veces con PBS y se bloquearon durante 1 hora como mínimo con RPMI 1640 suplementado con:

- 10% FCS Gold
- 2 mM de L-glutamina
- 50 UI/ml de penicilina
- 50 μ g/ml de estreptomicina
- 50 μ M de 2-mercaptoetanol

Los esplenocitos de los ratones se cultivaron durante 20 horas a 37°C, 5% CO₂ y 100% humedad a una concentración de $0,5 \times 10^6$ CMN por ml en un volumen final de 200 μ l en medio RPMI 1640 suplementado con:

- 10% FCS Gold
- 2 mM de L-glutamina
- 50 UI/ml de penicilina
- 50 μ g/ml de estreptomicina
- 50 μ M de 2-mercaptoetanol
- 10 μ g/ml del péptido MOG₄₀₋₅₅

Como controles se incluyeron esplenocitos cultivados en medio suplementado sin el antígeno MOG₄₀₋₅₅ como control negativo o con acetato de forbol miristato (PMA) a 20 ng/ml (Sigma Chemical, CO.) y ionomicina 1 μ M (Sigma Chemical, CO.) como control positivo.

Después de las 20 horas de incubación, la placa se lavó cinco veces con PBS y se le añadió el anticuerpo de detección biotinado anti-IFN- γ murino (clon R4-62A2) a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ en PBS + 0,5% FCS. Pasadas las 2 horas de incubación a temperatura ambiente y tras lavar la placa cinco veces con PBS, se añadió la estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina diluida 1:1000 en PBS + 0,5% FCS y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez lavada la placa con PBS se reveló añadiendo solución de sustrato BCIP/NBT-plus previamente filtrada con un filtro de jeringa de 0,45 μm . La reacción se paró cuando se detectó la aparición de puntos coloreados o *spots* lavando la placa varias veces con agua destilada. Los puntos coloreados se contaron con el lector *AID ELISPOT Reader* (Autoimmune Diagnostika GmbH) y los datos fueron analizados con el *AID ELISPOT software* (Autoimmune Diagnostika GmbH).

8.2.2- Cuantificación de la frecuencia de células productoras de IFN- γ específicas para EGFP

Se utilizó el mismo procedimiento que el descrito en el apartado 8.2.1 con leves modificaciones, que se detallan en este apartado.

Como células presentadoras de antígeno se usaron tres clones de la línea celular EL4 que expresaban la EGFP a diferentes intensidades con la finalidad de determinar si la producción de IFN- γ dependía de la intensidad de expresión de la EGFP. Para ello, se transdujo la línea celular EL4 con el sobrenadante de la línea productora NX-e/EGFP16 y se realizó una separación de células EGFP⁺ individuales mediante el dispositivo de autoclón del citómetro FACS Aria. Las células se cultivaron en el medio y condiciones que se describe en el apartado 2 de esta sección hasta que se observó por microscopía óptica el crecimiento de clones. Tras analizar la expresión de la EGFP por citometría de flujo, se eligieron tres clones según el valor de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de la EGFP.

Las células presentadoras, previamente irradiadas con una fuente de ¹³⁷Cs a una dosis de 30 Gy, se sembraron a una densidad de 0,25 x 10⁶ células por ml junto con los esplenocitos de los ratones a estudiar. Además, éstos también se cultivaron con células EL4 *Wild Type* (WT) igualmente irradiadas (como control negativo) o con 50 ng/ml de PMA y ionomicina 1 μM (como control positivo). La incubación de los esplenocitos se realizó durante 22-24 horas.

8.3- ELISPOT para detectar la producción de IL-17

Se usó el kit *Mouse IL-17 ELISPOT Ready-Set-Go!* (eBiosciences) para determinar el número de células T específicas frente a MOG₄₀₋₅₅ productoras de IL-17. Las placas para ELISPOT con membrana de PVDF de 96 pocillos (Millipore) se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo de captura anti-IL-17 de ratón (clon eBioTC11-18H10) diluido 1:250 en *ELISPOT Coating Buffer* (eBiosciences). Al día siguiente se descartó de la placa la solución que contenía el anticuerpo y la placa se lavó dos veces con *ELISPOT Coating Buffer*. Se añadió RPMI 1640 suplementado (ver apartado 8.2.1) y se incubó durante 1 hora como mínimo para bloquear la placa. Una vez decantado el medio, se sembraron los esplenocitos a una concentración de 5×10^6 CMN por ml en un volumen final de 200 μ l en el medio RPMI 1640 suplementado (descrito en el apartado 8.2.1) que contenía el péptido MOG₄₀₋₅₅ a una concentración de 5 μ g/ml durante 20 horas a 37°C, 5% CO₂ y 100% humedad. Como controles se incluyeron esplenocitos cultivados en medio suplementado sin el antígeno MOG₄₀₋₅₅ como control negativo o con 20 ng/ml de PMA y ionomicina 1 μ M como control positivo.

Después de 20 horas de incubación se lavó la placa cinco veces con PBS + 0,05% Tween-20. El anticuerpo de detección anti-IL-17 biotinado de ratón (clon eBioTC11-8H4) se diluyó en *Assay Diluent* (eBiosciences) y se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente. La placa se lavó cinco veces con PBS + 0,05% Tween-20 y seguidamente se le añadió estreptavidina conjugada a peroxidasa diluida 1:250 en *Assay Diluent*. Tras 45 minutos de incubación a temperatura ambiente, se lavó la placa tres veces con PBS + 0,05% Tween-20 y dos con PBS. Se añadió la solución de sustrato AEC, que se preparó como se describe a continuación:

- Solución *stock* de AEC: disolver 100 mg de AEC (Sigma Chemical, CO.) en 10 ml de N,N Dimetilformamida (Sigma Chemical, CO.).
- Añadir 333 μ l de solución *stock* de AEC a 10 ml de solución acetato 0,1 M a pH 5.
- Filtrar la solución con un filtro de jeringa de 0,45 μ m.
- Justo antes de su utilización, añadir 5 μ l de H₂O₂ al 30% (Sigma Chemical, CO.).

La reacción se paró cuando se detectó la aparición de puntos coloreados o *spots* lavando la placa varias veces con agua destilada. Los puntos coloreados se contaron con el lector *AID ELISPOT Reader* y los datos fueron analizados con el *AID ELISPOT software*.

8.4- Determinación de anticuerpos anti-MOG y anti-EGFP en suero mediante ELISA

8.4.1- ELISA para detectar anticuerpos anti-MOG₄₀₋₅₅

La SP de los ratones se obtuvo como se describe en el apartado 4.5.3. Posteriormente se centrifugó a 3000 g durante 30 minutos; se extrajo el suero de cada muestra, se alicuotó en dos tubos y se congeló a -80°C hasta el momento del análisis.

Se incubó péptido MOG₄₀₋₅₅ toda la noche a 4°C en placas *Nunc Immuno plates MaxiSorp surface* de 96 pocillos de fondo plano (Nalgene Nunc™ International) a una concentración final de 0,1 µg por pocillo (1 µg/ml) en solución de carbonato sódico a un pH de 9,6. Al día siguiente se lavaron las placas dos veces con PBS + Tween-20 al 0,1% (solución de lavado) y posteriormente se bloquearon con solución de bloqueo (leche desnatada en polvo al 5% en PBS) durante 1 hora a 37°C. Después de dos lavados, los sueros previamente diluidos (1:50) en solución de bloqueo se incubaron por duplicado durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se lavó la placa y se añadió el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG (H+L) de ratón conjugado a peroxidasa (Caltag Laboratories) diluido 1:3000 en solución de lavado y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de tres lavados se añadió la solución de substrato *TMB Substrate Reagent Set* (Becton-Dickinson) que contiene peróxido de hidrógeno y un cromógeno y a los 10 minutos la reacción se paró con ácido sulfúrico 1 M. La densidad óptica se leyó en un espectrofotómetro (Anthos Labtec) para placas con un filtro de 450 nm.

Se incluyeron sueros de ratones no inmunizados como controles negativos para normalizar los resultados. Al no disponer de un anticuerpo con concentración conocida para realizar una curva patrón que permitiera extrapolar la concentración de anticuerpos presentes en cada muestra, los resultados se presentan como la proporción o *ratio* entre la media de los duplicados de cada muestra y la media de los controles negativos incluidos en cada placa analizada. Se consideraron positivas aquellas muestras con *ratios* iguales o superiores a 3.

8.4.2- ELISA para detectar anticuerpos anti-EGFP

Se incubó la proteína recombinante EGFP (BioVision) toda la noche a 4°C a una concentración de 3 µg/ml (0,3 µg/pocillo) en las condiciones descritas en el apartado

8.4.1. Para este ensayo se disponía de un anticuerpo monoclonal comercial (Clontech) que reconoce a la proteína EGFP, lo que permitió generar una curva estándar para cuantificar la concentración de anticuerpos anti-EGFP presentes en cada muestra. El resto del procedimiento es idéntico al descrito en el apartado 8.4.1. Asimismo, se incluyeron como controles sueros de ratones no trasplantados. Los resultados se presentan como concentraciones expresadas en ng/ml.

9- ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

9.1- Marcaje de células hematopoyéticas por técnicas de inmunofluorescencia

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

9.1.1- Marcaje de superficie directo

1. Lavar las células ($0,5 \times 10^6$ CMN de los tejidos hematopoyéticos o 50 μ l 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 μ l 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 4°C en la oscuridad.
4. Lavar con 1 ml de PBA-azida.
5. Lisis de los eritrocitos con la solución de lisis *Pharm Lyse solution* (BD Pharmingen).
Incubar 10' a 37°C.
6. Lavar con 1 ml de PBA-azida.
7. Resuspender en 300-400 μ l PBA-azida.
8. Añadir 1 μ l del marcador de viabilidad 7-aminoactinomicina D (7-AAD; Molecular Probes) a 1 mg/ml.
9. Adquirir en el citómetro de flujo.

9.1.2- Marcaje de superficie indirecto

1. Lavar las células ($0,5 \times 10^6$ CMN de los tejidos hematopoyéticos o 50 μ l de SP) con 1 ml de PBA-azida.
2. Bloqueo de los receptores Fc: añadir un 10% de suero de ratón o bien 1 μ l del anticuerpo de rata anti-CD16/CD32 de ratón.
Incubar 10' a temperatura ambiente.
3. Añadir los anticuerpos específicos y los controles de isotipo primarios sin conjugar.
Incubar 30' a 4°C.
4. Lavar con 1 ml de PBA-azida.
5. Añadir el anticuerpo secundario de cabra anti-rata (GAR) conjugado con un fluorocromo.
Incubar 30' a 4°C en la oscuridad.
6. Lavar con 1 ml de PBA-azida.
7. Lisis de 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 300-400 μ l PBA-azida.
10. Añadir 1 μ l de 7-AAD a 1 mg/ml.
11. Adquirir en el citómetro de flujo.

9.1.3- Marcaje intracelular indirecto

1. Lavar las células ($0,5 \times 10^6$ CMN de los tejidos hematopoyéticos o 50 μ l de SP) con 1 ml de PBA-azida.
2. Bloqueo de los receptores Fc: añadir un 10% de suero de ratón o bien 1 μ l del anticuerpo de rata anti-CD16/CD32 de ratón.
Incubar 10' a temperatura ambiente.
3. Fijar y permeabilizar: añadir 250 μ l 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 μ l *Perm/Wash buffer*.
Marcaje intracelular: añadir el anticuerpo específico y el control de isotipo primario.
Incubar 30' a 4°C.

6. Lavar 2 veces con 1 ml de *Perm/Wash buffer*.
7. Resuspender en 50 μ l *Perm/Wash buffer*.
8. Añadir el anticuerpo secundario GAR conjugado con un fluorocromo.
Incubar 20' a 4°C y en la oscuridad.
9. Lavar dos veces con 1 ml de *Perm/Wash buffer*.
10. Resuspender en 300-400 μ l PBA-azida.
11. Adquirir en el citómetro de flujo.

9.1.4- Determinación de la concentración de citocinas solubles en el medio de cultivo de esplenocitos

En este procedimiento se cuantifica la concentración de citocinas secretadas al medio de cultivo por parte de los esplenocitos activados según el procedimiento descrito en el apartado 8.1. Para ello se usó el kit comercial *FlowCytomix Th1/Th2 10plex* (Bender MedSystems Inc.), que permite detectar las siguientes citocinas: GM-CSF, IFN- γ , IL1- α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17 y TNF- α . Este tipo de análisis se basa en esferas que están recubiertas de anticuerpos específicos para las citocinas mencionadas y que tienen dos tamaños distintos (4 y 5 μ m), por lo que se pueden diferenciar en el citómetro combinando los parámetros *side scatter* y *forward scatter* (SS y FS). Además, para cada tamaño de esfera se distinguen cinco poblaciones distintas ya que emiten diferentes intensidades de fluorescencia de un fluorocromo interno con el que están conjugadas que emite a 690 nm, pudiéndose detectar con el tercer o con el cuarto detector de fluorescencia (FL-3 o FL-4). Una vez las citocinas se han unido a los anticuerpos específicos que recubren las esferas, se añaden unos anticuerpos específicos para las citocinas (que reconocen otros epítopes distintos de la misma), conjugados con biotina y finalmente se añade estreptavidina unida a ficoeritrina (PE; fluorocromo que se detecta en el segundo detector de fluorescencia o FL-2) para determinar la concentración de citocinas presentes en la muestra.

9.2- Eficiencia de transducción

Antes del trasplante, 24 horas 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 7-AAD. 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. Cuando fue necesario se calculó la *ratio* de la MFI en relación a la MFI del control negativo.

9.3- Quimerismo del donante y quimerismo molecular

Para analizar el porcentaje de células del donante presentes en los receptores trasplantados se realizó un marcaje directo en SP, MO, timo y bazo con los siguientes anticuerpos:

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	$\mu\text{g por } 10^6$ células	Casa comercial
Anti-CD45.1 de ratón	PE	IgG2a, κ de ratón	A20	0,05	eBiosciences Biolegend
Anti-CD45.2 de ratón	APhC (aloficocianina)	IgG2a, κ de ratón	104	0,05	eBiosciences Biolegend

9.4- Expresión de los transgenes li e liMOG

Para analizar la sobreexpresión de la li murina en células de MO transducidas se realizó un marcaje intracelular indirecto con los siguientes anticuerpos:

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	$\mu\text{g por } 10^6$ células	Casa comercial
Anti-CD74 de ratón	Purificado	IgG2b, κ de rata	In-1	1	BD Pharmingen
Secundario anti-rata	APhC	IgG (H+L) de cabra	-	0,2	Caltag

9.5- Linajes y poblaciones hematopoyéticas

Para el estudio de las diferentes poblaciones hematopoyéticas derivadas de células del donante en los ratones trasplantados se realizaron marcajes directos e indirectos de células de bazo y de células de MO cultivadas con los siguientes anticuerpos:

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	µg por 10⁶ células	Casa comercial
Anti-B220 de ratón	Purificado	IgG2a de rata	RA3-6B2	1	Caltag
Anti-Mac1 de ratón	Purificado	IgG2b,κ de rata	M1/70	0,5	BD Pharmingen
Anti-Gr1 de ratón	Purificado	IgG2b,κ de rata	RB6-8C5	4	BD Pharmingen
Secundario anti-rata	APhC	IgG (H+L) de cabra	-	0,2	Caltag
Anti-CD3e de ratón	APhC	IgG1,κ de hamster armenio	145-2C11	0,5	BD Pharmingen
Anti-CD45.1 de ratón	PE	IgG2a de ratón	A20	0,05	eBiosciences Biolegend

9.6- Análisis y valoración de los datos citométricos

Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton-Dickinson) equipado con dos láseres, uno de argón (azul, emite a 488 nm) y uno de helio-neón (rojo, emite a 635 nm), además de seis fotomultiplicadores: SS (cuantifica la complejidad celular), FS (cuantifica el tamaño celular) y cuatro detectores de fluorescencia: FL-1 (530 nm), FL-2 (585 nm), FL-3 (>650 nm), FL-4 (>670 nm). Los tres primeros detectores de fluorescencia detectan los fotones producidos por la excitación de los fluorocromos con el láser azul, mientras que el cuarto detector de fluorescencia (FL-4) detecta los fotones que se emiten por la excitación de los fluorocromos con el láser rojo. Esta configuración, por lo tanto, permite el análisis simultáneo de cuatro fluorescencias.

Una vez adquiridas las muestras, se procedió a analizar y valorar los datos obtenidos con el programa de análisis *Diva software* (Becton-Dickinson). 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 (Fig. 20).

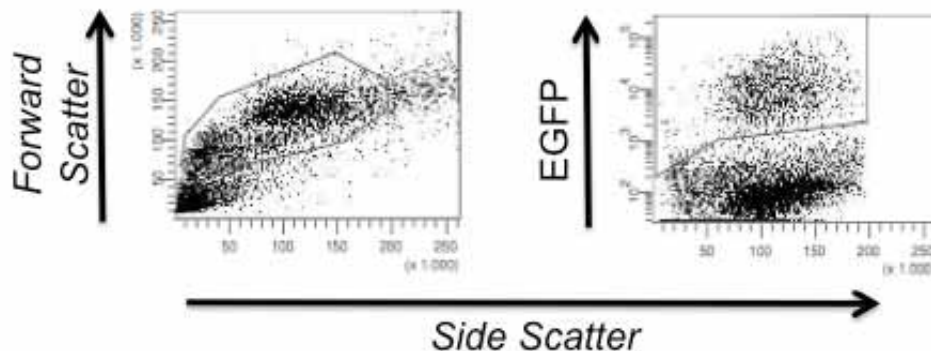


Fig. 20- Ejemplo de histogramas biparamétricos. En el histograma de la izquierda se define la población celular a analizar y en el de la derecha el porcentaje de células viables que expresan el gen marcador EGFP.

- *Quimerismo del donante y quimerismo molecular:* además del histograma para descartar las células muertas, se combinó el parámetro CD45.1-PE (FL-2) con el parámetro CD45.2-ApHC (FL-4), que permitía discriminar las células hematopoyéticas CD45⁺ de las CD45⁻ (fundamentalmente eritrocitos) y calcular el porcentaje de células del donante (CD45.1⁺) respecto al total de células CD45⁺ (CD45.1⁺ + CD45.2⁺), es decir, el injerto hematopoyético o quimerismo del donante. El último histograma para este tipo de análisis permitía determinar el porcentaje de quimerismo molecular (células EGFP⁺) respecto al total de células CD45⁺ mediante la combinación de EGFP (FL-1) con CD45.1-PE (FL-2) (Fig. 21).
- *Expresión de los transgenes li e liMOG:* para determinar la expresión de li e liMOG se combinaron el parámetro SS con CD74-ApHC (FL-4) para cuantificar el porcentaje total de células que expresaban li. También se combinó la detección de EGFP (FL-1) con CD74-ApHC para cuantificar el porcentaje de células transducidas que expresaban li.
- *Linajes y poblaciones hematopoyéticas:* una vez excluidas las células muertas se analizaron los histogramas que combinaban FL-1 (EGFP) y FL-2 (CD45.1-PE) con FL-4 (Mac1, Gr1, B220 y CD3, todos ellos conjugados con ApHC directa o indirectamente) para determinar los tipos celulares o linajes

hematopoyéticos que provenían del donante y que expresaban el vector retroviral.

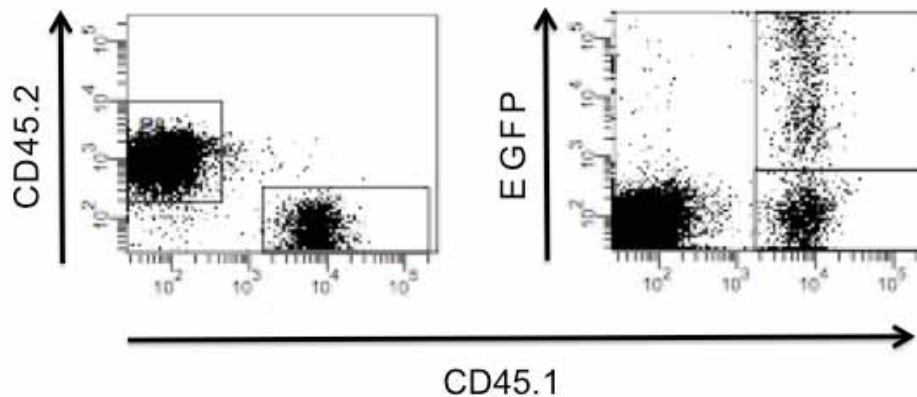


Fig. 21- Ejemplo de histogramas biparamétricos para el cálculo del quimerismo del donante y molecular en los ratones trasplantados. Análisis correspondiente a una muestra de SP de un ratón trasplantado. En el histograma de la izquierda se distinguen las células que provienen del donante (CD45.1⁺) de las del receptor (CD45.2⁺). En el histograma de la derecha se distinguen las células del donante que expresan el vector retroviral (CD45.1⁺ EGFP⁺) de las células del donante no transducidas (CD45.1⁺ EGFP⁻).

- *Determinación de la concentración de citocinas solubles en el sobrenadante del cultivo de esplenocitos:* se combinaron los parámetros FS y SS para discriminar las dos poblaciones de esferas de tamaños distintos además de los parámetros FL-4 con FL-2 para distinguir las cinco poblaciones diferentes en cada tamaño de esfera (FL-4) y determinar la concentración de las distintas citocinas presentes en la muestra (FL-2). Los resultados se presentan como concentraciones expresadas en pg/ml.

10- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se analizaron mediante diferentes pruebas estadísticas con el programa informático SPSS v10.0 (SPSS, Inc.) o con el programa GraphPad Prism v4.0 (GraphPad software, Inc.), con el que también se realizaron los gráficos. Según las variables a analizar y la distribución de las mismas, se usaron pruebas tales como la Chi-cuadrado, el análisis de varianza (ANOVA) de un factor, la prueba *t* de Student o su prueba equivalente no paramétrica Mann-Whitney. En todos los casos se consideró que la diferencia era estadísticamente significativa cuando la *p* era inferior a 0,05.

Material y Métodos

Se aplicaron pruebas paramétricas cuando la distribución de los datos de los grupos a comparar era normal (varianzas similares). Las pruebas utilizadas incluyeron la de la t de Student cuando se comparaban las medias de dos conjuntos de datos independientes o la prueba de ANOVA de un factor para el estudio de la varianza de una variable cuantitativa dependiente en más de dos conjuntos de datos independientes aplicando posteriormente el procedimiento de Bonferroni para comparar los conjuntos de datos dos a dos.

Cuando la distribución de los datos no era normal (varianzas diferentes), se aplicaron pruebas estadísticas no paramétricas como la prueba de Mann-Whitney para la comparación de la media de dos conjuntos de datos independientes (prueba no paramétrica homóloga a la paramétrica t de Student), la prueba de Fisher cuando se estudiaban variables cualitativas de dos conjuntos de datos o la Chi-cuadrado cuando se estudiaban variables cualitativas de más de dos conjuntos de datos.