



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

# RESULTADOS

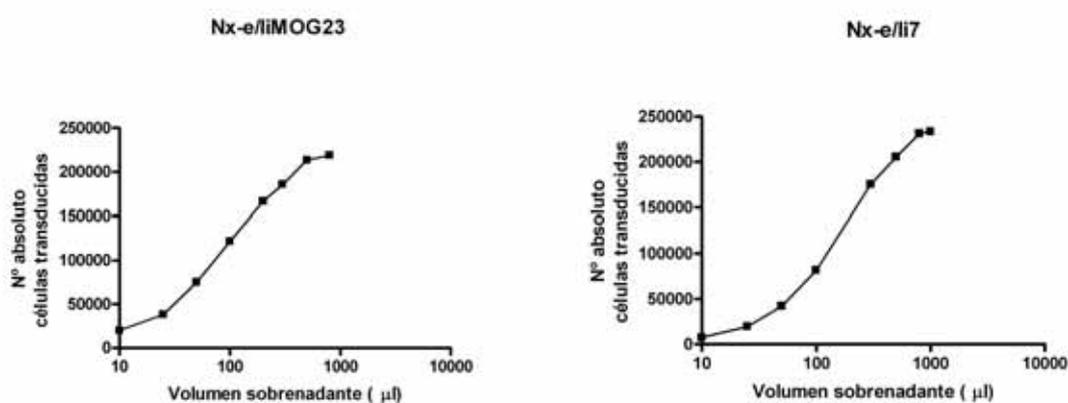


**PARTE I. INDUCCIÓN DE TOLERANCIA EN LA EAE MEDIANTE LA EXPRESIÓN DE UN AUTOANTÍGENO EN EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO: APROXIMACIONES PREVENTIVAS Y TERAPÉUTICAS**

**1- OBTENCIÓN DE LÍNEAS PRODUCTORAS DE TÍTULO VIRAL ELEVADO**

Con el objetivo de obtener sobrenadantes ricos en partículas virales que permitieran la transducción eficiente de las células de MO, se crearon líneas productoras de los retrovirus recombinantes SF91-liMOG-IRES-EGFP y SF91-li-IRES-EGFP, generadas a partir de la línea empaquetadora NX-ecotrópica.

Se eligieron aquellos clones que producían una mayor cantidad de vectores y se calculó sus títulos virales usando el procedimiento y la fórmula indicada en el apartado 3 de la sección Material y Métodos. El título viral aproximado de la línea NX-e/li7 fue de  $0,8 \times 10^6$  PI/ml, y de  $2 \times 10^6$  PI/ml para la línea productora NX-e/liMOG23 (Fig. 22).



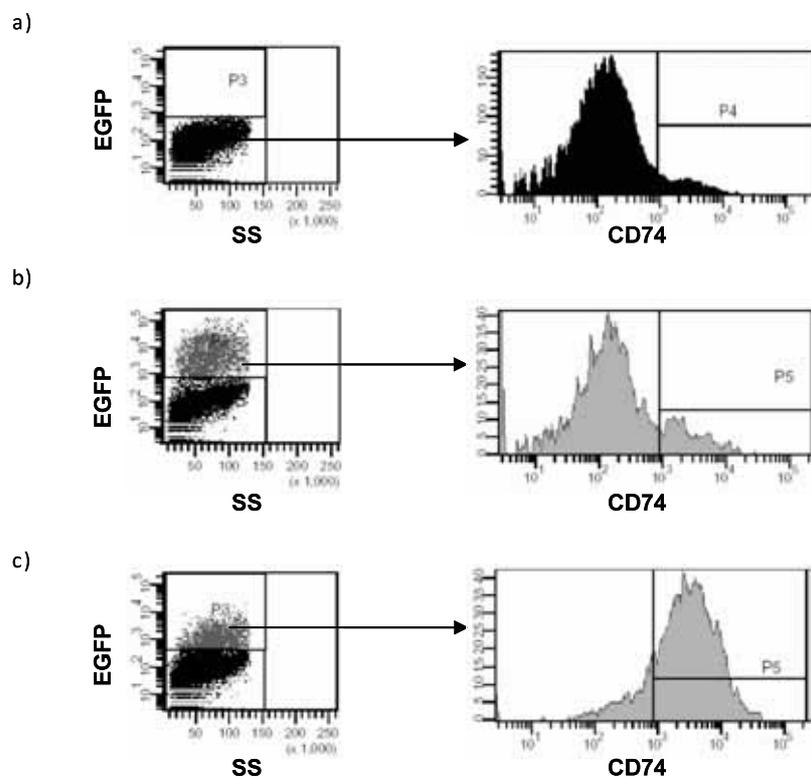
**Fig. 22- Curvas de titulación de las líneas productoras NX-e/li7 y NX-e/liMOG23.** La titulación se realizó sobre células NIH/3T3 utilizando volúmenes crecientes del sobrenadante viral de ambas líneas celulares. El título viral aproximado se calculó a partir de los valores de la parte lineal (más sensible de la curva).

**2- EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS TRANSGENES**

Una vez obtenidas las líneas productoras se procedió a determinar la expresión de la li murina en células de MO por citometría de flujo. Con este fin se transdujo MO murina con el sobrenadante de las líneas productoras NX-e/liMOG23, NX-e/li7 y NX-

e/EGFP16, esta última como control. Posteriormente, se marcaron con el anticuerpo monoclonal de rata anti-CD74 (li) de ratón.

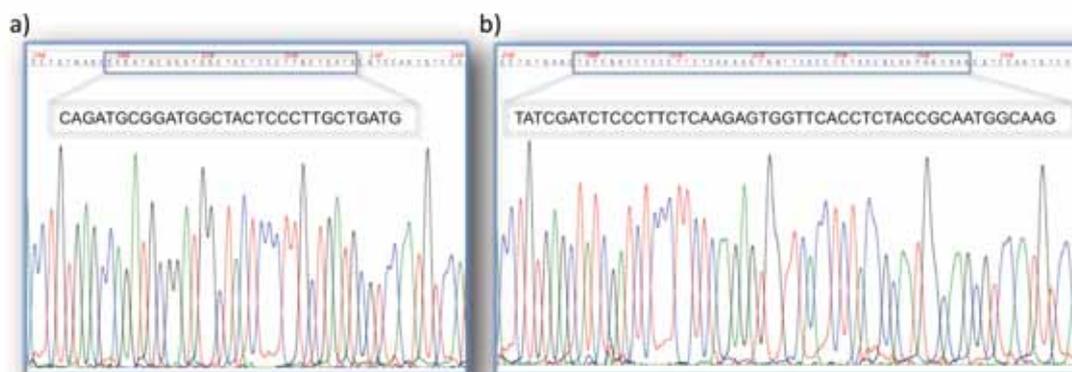
El porcentaje de expresión de li aumentó en las células transducidas con los vectores SF91-liMOG-IRES-EGFP y SF91-li-IRES-EGFP, pero no en las transducidas con el vector SF1-EGFP, que expresaban porcentajes de li similares al basal de la MO no transducida (Fig. 23). Además, todas las células transducidas con los vectores anteriormente mencionados que expresaban la proteína EGFP, coexpresaban li. Estos resultados indican que la sobreexpresión de li observada en las células de MO transducida está inducida específicamente por los vectores conteniendo li e liMOG.



**Fig. 23- Expresión *in vitro* de los transgenes.** a) Expresión basal de li (CD74) en células de MO no transducida. Cuando la MO se transduce con un vector que sólo expresa la EGFP, el porcentaje de li en la fracción de células transducidas es similar al basal (b), mientras que éste aumenta significativamente al transducir las células con los vectores que contienen liMOG (aquí representado) o li, observándose la coexpresión de la li y la EGFP en la inmensa mayoría de las células transducidas (c).

Para comprobar la presencia de la secuencia que codifica para el péptido MOG<sub>40-55</sub> en el transgén liMOG (en la que se substituyó la secuencia correspondiente a la región CLIP de la li por la que codifica para el péptido encefalitogénico), se transdujeron células de MO con los vectores SF91-liMOG-IRES-EGFP y SF91-li-IRES-EGFP. Se extrajo el ADN y se usó como molde para amplificar ambos transgenes liMOG e li, y posteriormente secuenciarlos. En la Figura 24 se muestran las secuencias

correspondientes a la región CLIP del transgén li (Fig. 24a) que es substituido por la secuencia de MOG<sub>40-55</sub> (Fig. 24b).



**Fig. 24- Secuenciación del ADN de MO transducida con los vectores SF91-li-IRES-EGFP y SF91-liMOG-IRES-EGFP.** Se secuenció el ADN de MO transducida con ambos vectores con un par de *primers* específicos del vector retroviral. El recuadro muestra la secuencia WT de la región CLIP de la li murina (a) y la secuencia que codifica para el péptido MOG<sub>40-55</sub>, y que reemplaza a la secuencia salvaje de la región CLIP de la li murina (b).

### 3- EFICIENCIA DE TRANSDUCCIÓN DE LAS CÉLULAS MURINAS DE MO

En cada experimento, justo antes del trasplante se evaluó la eficiencia de transducción obtenida (24 horas después del último ciclo de transducción). Usando una MOI aproximada de 1 en cada ciclo de transducción, la eficiencia media en el conjunto de experimentos fue de  $21,5 \pm 7,9\%$  para el vector SF91-liMOG-IRES-EGFP,  $15,6 \pm 3,9\%$  para el vector SF91-li-IRES-EGFP y  $21,8 \pm 6,5\%$  para el vector SF1-EGFP.

### 4- EFECTO DEL RÉGIMEN DE ACONDICIONAMIENTO SOBRE LA EAE REMITENTE-RECURRENTE

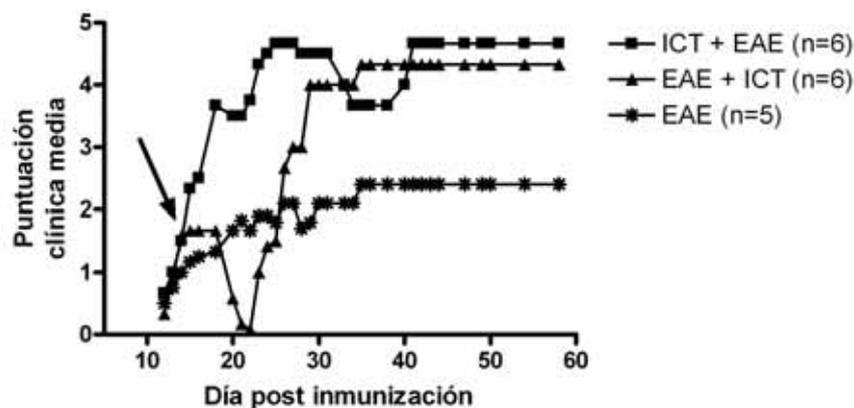
Se realizó un experimento para descartar un posible efecto del acondicionamiento sobre la incidencia o el curso de la EAE, tanto antes de inducir la enfermedad como cuando la enfermedad ya estaba establecida. Para ello se usó el modelo remitente-recurrente de la EAE. Se inmunizaron ratones de la cepa SJL/J con el péptido PLP<sub>139-</sub>

151-

#### 4.1- La irradiación empeora los signos clínicos de la enfermedad

Los ratones que fueron irradiados un mes antes de la inmunización con una dosis subletal de 4 Gy de ICT desarrollaron una enfermedad mucho más grave que los

animales del grupo control (Fig. 25). Cuando la ICT se aplicó a ratones con la enfermedad ya establecida, la mayoría de éstos presentaron una remisión completa de los signos clínicos para después desarrollar un segundo brote mucho más severo y similar al curso clínico que presentaron los ratones que habían recibido la ICT un mes antes de la inmunización (Fig. 25).



**Fig. 25- Efecto de la irradiación sobre la EAE.** Los signos clínicos de la enfermedad se agravaron respecto al grupo control cuando la radiación se administró un mes antes de la inmunización y cuando la ICT se administró a ratones con la enfermedad establecida. El gráfico representa la media de la puntuación clínica diaria para cada grupo experimental. La flecha indica el día de la irradiación en este grupo de animales.

EAE: grupo control de enfermedad; EAE + ICT: grupo irradiado 16 días post inmunización; ICT + EAE: grupo irradiado un mes antes de la inmunización.

Aunque los ratones irradiados antes de la inmunización con 4 Gy de ICT empezaron a desarrollar signos clínicos a la vez que los ratones control (día de inicio de la enfermedad  $14,3 \pm 2,1$  y  $15,0 \pm 2,4$  respectivamente,  $p=0,635$ ), la puntuación clínica máxima alcanzada en éstos fue superior respecto a la alcanzada por los ratones control (ICT + EAE:  $4,6 \pm 1,0$ ; EAE:  $3,1 \pm 1,3$ ;  $p=0,053$ ). La puntuación acumulada durante todo el seguimiento clínico sí se vio significativamente aumentada en los ratones irradiados (ICT + EAE:  $127,9 \pm 37,9$  y EAE:  $64,5 \pm 40,2$ ;  $p<0,05$ ), indicando una mayor gravedad de la enfermedad en este grupo a causa de la irradiación. Además, dos de los seis ratones del grupo de irradiación murieron a causa de la gravedad de la EAE, mientras que ninguno de los cinco animales control desarrolló una EAE mortal.

Resultados similares se observaron cuando la ICT se administraba en ratones con EAE ya establecida. Aunque los animales experimentaron una recuperación completa transitoria debida probablemente a la eliminación de las células que causan la inflamación, a continuación presentaron un brote mucho más grave en comparación

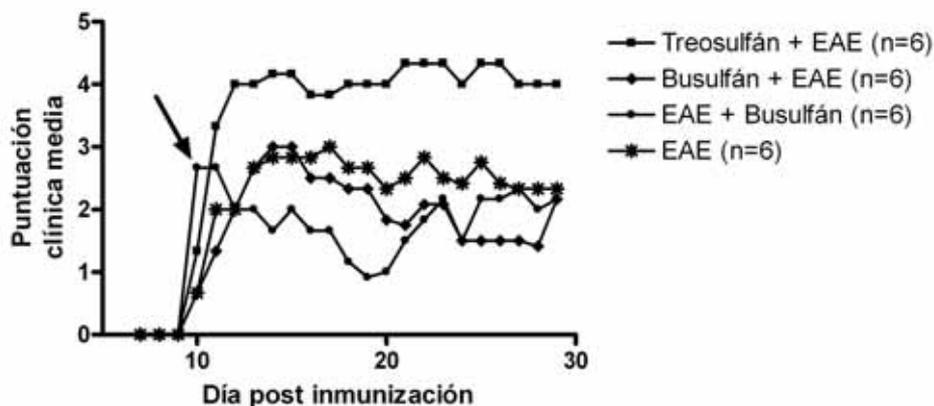
con la evolución observada antes del tratamiento. La puntuación clínica máxima alcanzada por el grupo de ratones irradiados después de la inmunización así como la puntuación clínica acumulada indicaban una mayor gravedad de la EAE en este grupo de ratones respecto a los ratones control (puntuación máxima:  $4,3 \pm 0,8$  versus  $2,7 \pm 1,3$  respectivamente;  $p < 0,05$ . Puntuación acumulada:  $93,1 \pm 6,3$  versus  $62,0 \pm 37,6$ ;  $p = 0,075$ ).

Estos datos indicaban que la irradiación por sí misma agravaba la enfermedad, por lo que, con el objetivo de encontrar pautas mínimamente mieloablativas que permitieran conseguir quimerismos estables con células hematopoyéticas transducidas decidimos ensayar dos agentes quimioterápicos que se usan en regímenes de acondicionamiento: el busulfán y el treosulfán.

#### **4.2- Dosis parcialmente mieloablativas de busulfán no modifican el curso clínico de la EAE**

La administración de tres dosis de 1000 mg/kg de treosulfán (durante tres días consecutivos) 20 días antes de la inmunización resultó en un empeoramiento del curso clínico, siendo la puntuación clínica acumulada significativamente inferior en el grupo control (Fig. 26) (Treosulfán:  $78,3 \pm 13,8$  versus EAE:  $37,3 \pm 30,2$ ;  $p < 0,05$ ). Por el contrario, el tratamiento con busulfán (dos dosis de 20 mg/kg los días 19 y 20 antes de la inmunización) no modificó de manera significativa el curso clínico de la enfermedad (puntuación clínica acumulada:  $39,7 \pm 40,3$ ,  $p = 0,909$ ) (Fig. 26).

Cuando el busulfán se administró a la misma dosis los días 11 y 12 post inmunización (p.i.), tampoco se observaron diferencias significativas en las variables clínicas respecto al grupo control (puntuación clínica acumulada:  $48,3 \pm 33,1$  y  $34,6 \pm 28,3$  respectivamente;  $p = 0,460$ ) (Fig. 26). Por ello decidimos usar el busulfán a la dosis indicada como acondicionamiento parcialmente mieloablativo para realizar el resto de experimentos.



**Fig. 26- Efecto del treosulfán y el busulfán sobre la EAE.** A diferencia del treosulfán, el busulfán no modificó de manera significativa el curso clínico de la EAE. El gráfico representa la media de la puntuación clínica diaria para cada grupo experimental. La flecha indica el primer día de administración del busulfán en el grupo con la EAE establecida.

Busulfán + EAE: grupo tratado con busulfán antes de la inmunización; EAE: grupo control de enfermedad; EAE + Busulfán: grupo tratado con busulfán después de la inmunización; Treosulfán + EAE: grupo tratado con treosulfán antes de la inmunización.

## **5- PREVENCIÓN DE LA EAE NO REMITENTE MEDIANTE LA CREACIÓN DE QUIMERISMO MOLECULAR EN EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO**

### **5.1- Dosis parcialmente mieloablativas de busulfán no modifican el curso clínico de enfermedad en el modelo no remitente**

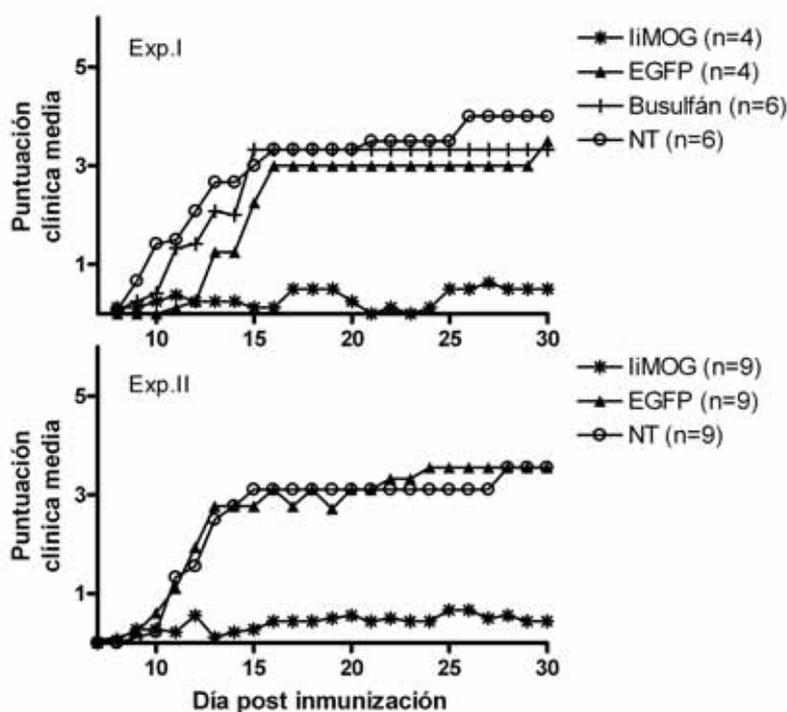
Hembras de la cepa C57BL/6J de cinco semanas de edad previamente acondicionadas con dos dosis de 20 mg/kg de busulfán, se trasplantaron con  $0,7-1 \times 10^6$  células de MO transducidas con el vector SF91-liMOG-IRES-EGFP (grupo liMOG) o con el vector control SF1-EGFP (grupo EGFP). Además, en uno de los experimentos se incluyó un grupo de ratones tratados sólo con busulfán para asegurar que el acondicionamiento no afectaba al curso de la EAE no remitente. Tres semanas después se inmunizaron y se evaluó tanto la incidencia como la gravedad de los signos clínicos.

El tratamiento con busulfán, igual que ocurría en el modelo remitente-recurrente de la EAE, no modificó significativamente el curso de la enfermedad. Todos los animales desarrollaron signos clínicos y la gravedad de éstos era comparable con la mostrada por los ratones no trasplantados del grupo control (Tabla 4 y Fig. 27 Exp.I).

Tabla 4- Efecto del acondicionamiento con busulfán en la EAE

	Incidencia (%)	Puntuación clínica máxima	Puntuación clínica acumulada
<b>Busulfán + EAE</b>	6/6 (100)	3,4 ± 1,4	61,0 ± 30,1
<b>EAE</b>	14/15 (93,3)	3,7 ± 1,0	63,0 ± 27,5
<b>Valor de p</b>	1	0,575	0,883

La administración de busulfán tres semanas antes de la inmunización no modificó el curso de la enfermedad en el modelo no remitente de la EAE. Los parámetros clínicos no son significativamente diferentes en el grupo de ratones tratados con busulfán (Busulfán + EAE) respecto al grupo de ratones control de la enfermedad (EAE). Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar (DS).



**Fig. 27- Tratamiento preventivo.** Los ratones trasplantados con células de MO que expresaban MOG<sub>40-55</sub> quedaron protegidos frente a la EAE o desarrollaron una enfermedad mucho más leve comparado con los grupos control. En uno de los experimentos se incluyó un grupo de ratones a los que se les administró busulfán para corroborar la ausencia de efecto del agente mielosupresor sobre la evolución de la EAE. El gráfico representa la media de la puntuación clínica diaria para cada grupo experimental. Busulfán: grupo tratado con busulfán; EGFP: grupo EGFP; liMOG: grupo liMOG; NT: grupo no trasplantado.

## 5.2- El trasplante de células de MO transducidas con el autoantígeno MOG<sub>40-55</sub> previene la EAE

Se realizaron dos experimentos independientes y los resultados se analizaron conjuntamente, correspondiendo por lo tanto a la suma de ambos. Los ratones del grupo liMOG quedaron protegidos frente a la enfermedad, efecto que no se observó en

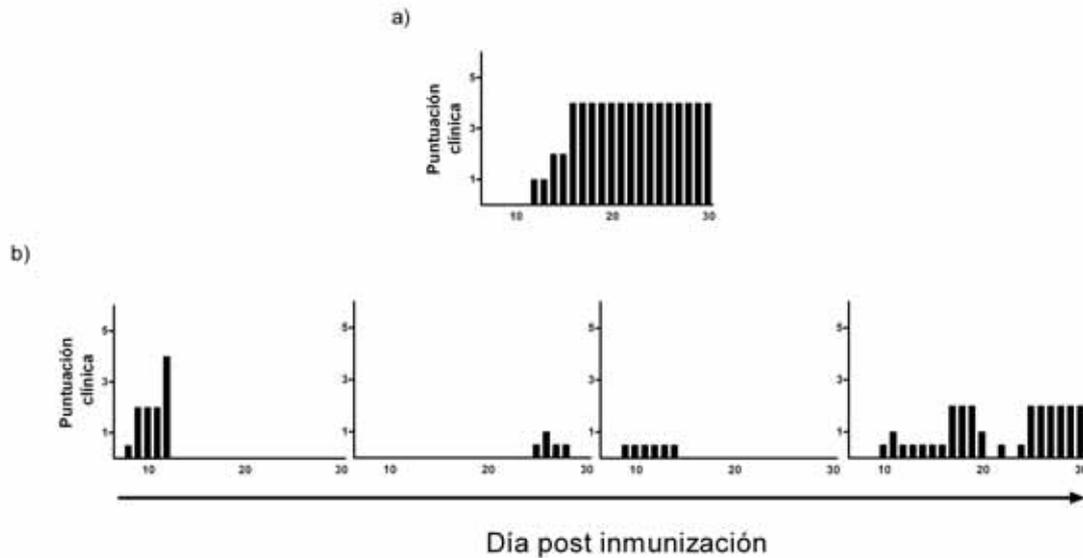
los grupos de ratones control, incluyendo los trasplantados con células de MO transducidas con el vector control (Fig. 27). Además de presentar una menor incidencia (5/13 en el grupo liMOG *versus* 11/13 o 14/15 en los grupos EGFP y no trasplantado o NT respectivamente; Tabla 5), la puntuación clínica máxima alcanzada y la puntuación clínica acumulada durante todo el seguimiento fue significativamente inferior en el grupo liMOG (Tabla 5).

**Tabla 5- El trasplante de MO transducida con un autoantígeno previene la aparición de la EAE**

	<b>Incidencia (%)</b>	<b>Puntuación clínica máxima</b>	<b>Puntuación clínica acumulada</b>
<b>liMOG</b>	5/13 (38,5)	0,9 ± 1,5	8,2 ± 18,7
<b>EGFP</b>	11/13 (84,6)	3,5 ± 1,7	58,4 ± 29,2
<b>NT</b>	14/15 (93,3)	3,7 ± 1,0	63,0 ± 27,5
<b>Valor de p</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>

Se representan las incidencias de la enfermedad y las puntuaciones clínicas máximas y acumuladas en los distintos grupos experimentales. La menor incidencia y puntuaciones clínicas en el grupo liMOG, indican que los animales quedaron protegidos frente a la EAE. La incidencia se expresa como frecuencia y porcentaje y las puntuaciones clínicas se expresan como la media ± DS. EGFP: grupo EGFP; liMOG: grupo liMOG; NT: grupo no trasplantado.

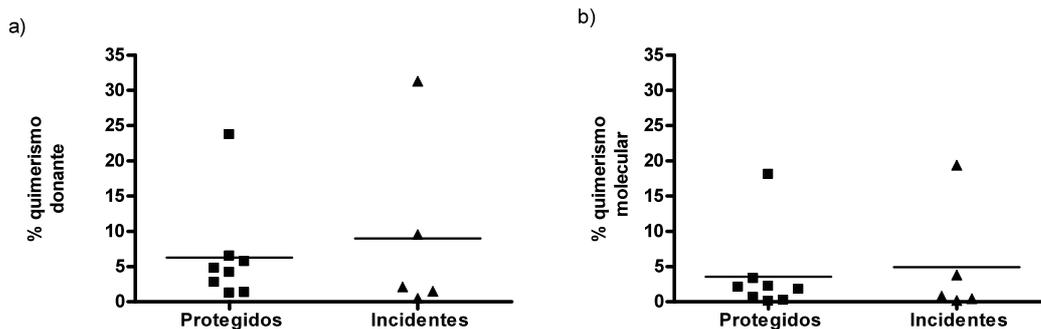
Los ratones incidentes del grupo liMOG no desarrollaron el típico curso clínico del modelo no remitente, sino que la mayoría de ellos presentaron signos clínicos muy leves y en algunos casos la enfermedad fue transitoria, tal y como se muestra en la Figura 28. Por ello, cuando se analizaron los parámetros clínicos de los ratones del grupo liMOG que sí desarrollaron signos clínicos respecto a los animales incidentes del grupo control de trasplante (EGFP), también se observaron una puntuaciones máximas y acumuladas significativamente más bajas en el grupo liMOG que en los ratones EGFP (máxima 2,3 ± 1,6 *versus* 4,2 ± 0,6;  $p < 0,01$ , y acumulada 21,2 ± 26,5 *versus* 69,0 ± 14,7;  $p < 0,001$ ).



**Fig. 28- EAE más leve en ratones trasplantados con células de MO expresando el autoantígeno.** Sólo un ratón incidente del grupo liMOG desarrolló el típico curso clínico del modelo no remitente (a), mientras que el resto experimentaron una EAE menos severa y/o transitoria (b). Los gráficos representan la puntuación clínica diaria de cada ratón.

### 5.3- El grado de protección frente a la EAE no está asociado al nivel de quimerismo molecular en los ratones trasplantados con MO transducida con el vector liMOG

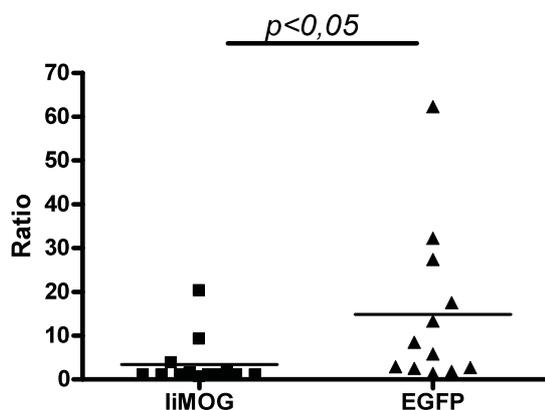
Tres semanas después del trasplante de MO y antes de la inmunización, se extrajo SP de los ratones y se evaluó el nivel de quimerismo del donante y quimerismo molecular. El trasplante con células de MO transducidas con el vector liMOG resultó en niveles detectables de quimerismo del donante (células CD45.1<sup>+</sup>) y quimerismo molecular (células EGFP<sup>+</sup>) en todos los ratones (7,3% ± 9,5 y 4,1% ± 6,6, respectivamente). No se halló relación alguna entre el nivel de quimerismo molecular y el desarrollo de signos clínicos, ya que animales con un elevado quimerismo molecular podían o no enfermar, mientras que niveles bajos de éste protegían de la enfermedad en algunos casos (Fig. 29).



**Fig. 29- Ausencia de asociación entre el nivel de quimerismo y la protección frente a la enfermedad.** Se muestran los niveles de quimerismo del donante (a) y quimerismo molecular (b) en los animales protegidos y los incidentes. En los ratones protegidos se observaron niveles de ambos parámetros similares a los de los no protegidos (incidentes), lo que indica que si bien el quimerismo molecular con autoantígeno es necesario para tener protección, el nivel de éste no se asocia con la protección frente a la EAE.

**5.4- Menor producción de anticuerpos anti-MOG<sub>40-55</sub> en ratones trasplantados con células de MO que expresan el autoantígeno**

Se obtuvo el suero de los ratones cuatro semanas después de la inmunización y se analizó por ELISA la presencia de anticuerpos IgG anti-MOG<sub>40-55</sub>. Comparado con el grupo EGFP, el porcentaje de ratones que presentaban reactividad frente al péptido era inferior en el grupo liMOG (liMOG: 23,1% y EGFP: 58,3%), siendo la media de la *ratio* significativamente más baja en los ratones trasplantados preventivamente con MO que expresaba el autoantígeno MOG<sub>40-55</sub> (liMOG: 3,4 ± 5,6 *versus* EGFP: 14,9 ± 18,2; *p*<0,05; Fig. 30).



**Fig. 30- Niveles de anticuerpos frente al péptido MOG<sub>40-55</sub> en el suero de ratones tratados preventivamente.** Se estudió la presencia de anticuerpos anti-MOG<sub>40-55</sub> en ambos grupos experimentales. Se halló un aumento significativo en el nivel de anticuerpos en el grupo EGFP. EGFP: grupo EGFP; liMOG: grupo liMOG.

Por otro lado, se comparó la media de la *ratio* entre los ratones del grupo liMOG protegidos y los incidentes. Tal y como se ve en la Figura 31, no se observaron diferencias significativas entre ellos (protegidos:  $2,4 \pm 2,9$  versus incidentes:  $4,7 \pm 8,6$ ;  $p=0,622$ ).

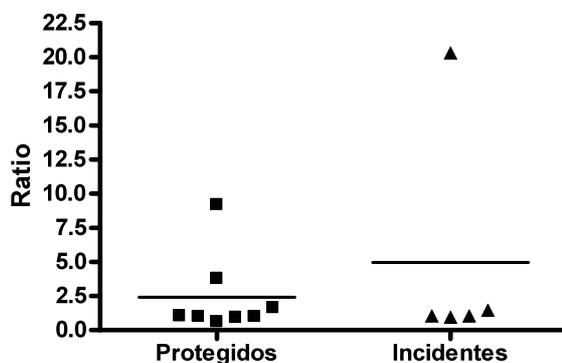


Fig. 31- La presencia de anticuerpos no predice la probabilidad de protección frente a la enfermedad. Se estudió la presencia de anticuerpos en relación a la aparición de signos clínicos sin observar diferencias entre los ratones que quedaron protegidos y los que desarrollaron la enfermedad.

## 6- MEJORÍA DEL CURSO CLÍNICO DE LA EAE NO REMITENTE ESTABLECIDA TRAS EL TRASPLANTE DE MO EXPRESANDO EL AUTOANTÍGENO

### 6.1- Los signos clínicos de la EAE revierten o mejoran tras el trasplante con células de MO expresando liMOG

Tras la aparición de los signos clínicos en la mayoría de los animales (día 16-17 p.i.), se distribuyeron a los ratones en los distintos grupos experimentales comparables clínicamente. Recibieron el acondicionamiento con busulfán y fueron trasplantados con  $0,6-1,6 \times 10^6$  células de MO transducida con el vector SF91-liMOG-IRES-EGFP (grupo liMOG) o con el vector control SF91-li-IRES-EGFP (grupo li). Después del trasplante se hizo el seguimiento clínico de forma ciega para eliminar el sesgo subjetivo del investigador.

Se llevaron a cabo tres experimentos independientes. En los dos primeros (I y II) se realizó un seguimiento clínico largo (104 y 94 días, respectivamente) mientras que en el tercero (III) se sacrificaron los animales 41 días p.i. con el fin de obtener tejidos para los estudios histopatológicos e inmunológicos. Los parámetros clínicos se analizaron teniendo en cuenta los datos obtenidos en los tres experimentos hasta el día común de seguimiento clínico diario (día 38 p.i.). Se definió como remisión la mejoría en la

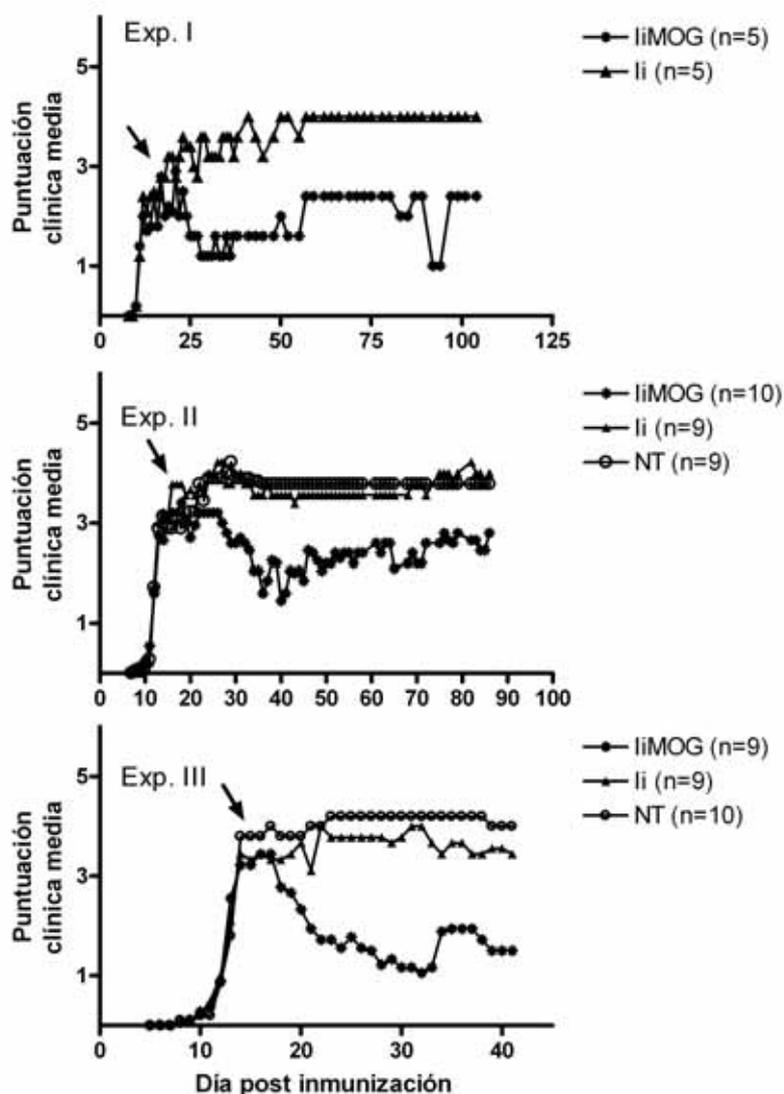
puntuación clínica durante tres días consecutivos respecto a la puntuación alcanzada el día del trasplante, mientras que la recuperación completa se definió como la remisión total de los signos clínicos (puntuación clínica = 0).

Una fracción significativa de los ratones que recibieron el trasplante de células de MO transducidas con el autoantígeno empezaron a mejorar clínicamente entre los días 2 y 16 post trasplante, manteniendo la mayoría de ellos la mejoría a lo largo de todo el tiempo de seguimiento (Fig. 32). Contrariamente, los grupos control continuaron desarrollando un patrón no remitente del curso de la EAE (Fig. 32). Además, en el grupo liMOG la puntuación clínica acumulada de los ratones que habían desarrollado la enfermedad antes del tratamiento fue significativamente inferior a la de los grupos control (liMOG:  $52 \pm 29,1$ ; li:  $80,6 \pm 14,5$ ; NT:  $85,9 \pm 19$ ,  $p < 0,001$ ).

Los signos clínicos de la enfermedad remitieron en una fracción significativa de los ratones del grupo liMOG en algún momento del seguimiento clínico (72,7%), mientras que en los grupos control este porcentaje fue significativamente menor (li: 30,4%; NT: 5,3%.  $p < 0,001$ ). El 22,7% (7/22) de los ratones del grupo liMOG se recuperaron completamente y 5 de ellos se mantuvieron sin signos clínicos de EAE hasta el final del experimento correspondiente, mientras que sólo se recuperó completamente un ratón de cada grupo control (li: 4,3%; NT: 5,3%.  $p < 0,05$ ).

### **6.2- Los parámetros histopatológicos mejoraron en los ratones trasplantados con células de MO que expresaban el autoantígeno**

A los 41 días p.i. se sacrificaron los ratones del experimento III y se obtuvieron la médula espinal y el cerebro de los 9 animales de cada grupo (liMOG, li, NT). Se realizó el estudio histopatológico para evaluar la presencia de inflamación, la composición del infiltrado inflamatorio (detección de marcadores específicos de células B, T y macrófagos/microglía), el grado de desmielinización (tinción con *luxol fast blue*) así como el daño y la degeneración axonal por detección específica de la APP y de neurofilamentos no fosforilados (SMI-32). El análisis histopatológico se realizó de forma ciega para eliminar el sesgo subjetivo del investigador.

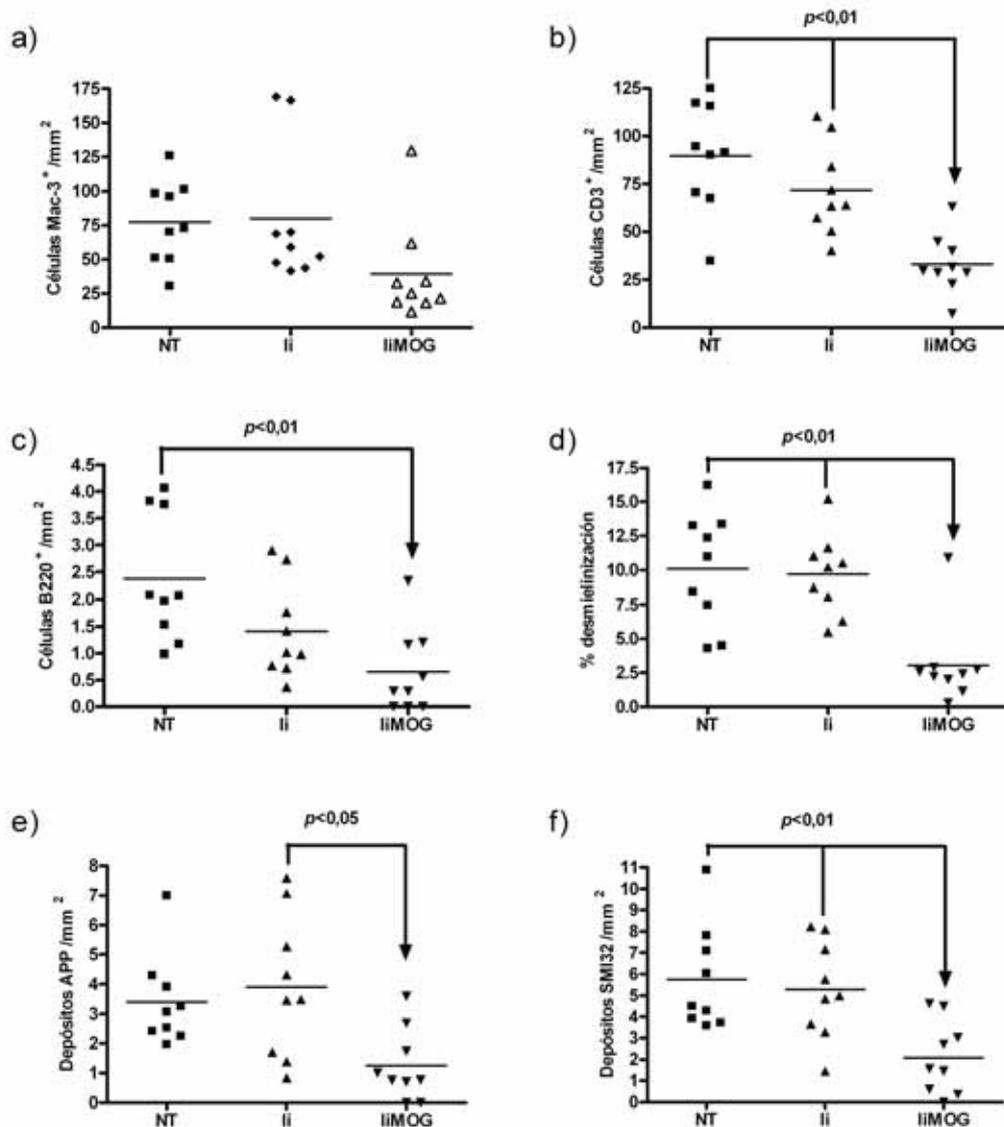


**Fig. 32- Mejoría de los signos clínicos en los ratones tratados con el autoantígeno.** Tras el trasplante de las células transducidas, el curso clínico del grupo li no se vio modificado por el tratamiento en ninguno de los experimentos, comportándose como el grupo control de enfermedad (NT). Por otro lado, pocos días después del trasplante los ratones del grupo liMOG experimentaron una mejoría en los signos clínicos que se mantuvo hasta el final del experimento. El gráfico representa la media de la puntuación clínica diaria para cada grupo experimental. La flecha indica el día del trasplante de células de MO transducidas en cada experimento.  
li: grupo li; liMOG: grupo liMOG; NT: grupo no trasplantado.

En concordancia con los resultados clínicos obtenidos, el patrón histopatológico de los ratones trasplantados con células de MO expresando el autoantígeno mostró menos alteraciones que los controles. El componente inflamatorio se vio reducido en los ratones del grupo liMOG; la presencia de macrófagos (Fig. 33a) estaba levemente reducida entre los distintos grupos (liMOG:  $39,3 \pm 36,9$ ; li:  $79,9 \pm 50,9$  y NT:  $77,3 \pm 30,3$ ;  $p > 0,05$  en ambos casos). El número de células T (Fig. 33b) estaba significativamente disminuido en el grupo liMOG ( $27,5 \pm 18,4$ ) respecto a los niveles

## Resultados

observados en los grupos control (li:  $71,9 \pm 23,7$  y NT:  $89,6 \pm 28,7$ ;  $p < 0,01$  y  $p < 0,001$  respectivamente). Finalmente, el número de células B (Fig. 33c) detectado en el SNC del grupo liMOG ( $0,5 \pm 0,7$ ) era menor, aunque no significativamente, respecto al grupo li ( $1,4 \pm 2,4$ ;  $p > 0,05$ ) y sí lo era respecto al grupo NT ( $2,4 \pm 1,2$ ;  $p < 0,01$ ).

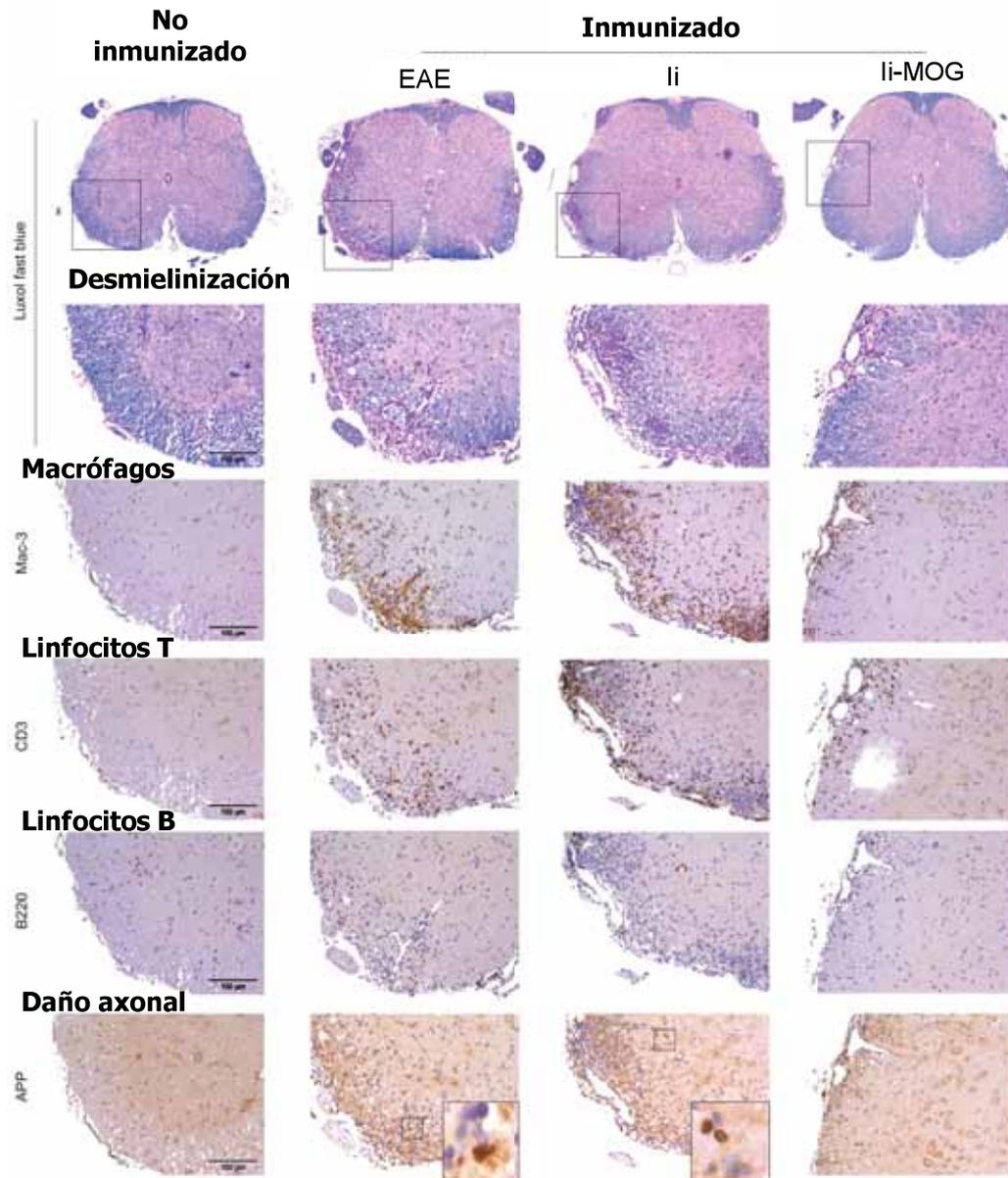


**Fig. 33- Reducción significativa del componente inflamatorio, de la desmielinización y del daño axonal en los ratones trasplantados con células de MO expresando el autoantígeno.** El infiltrado inflamatorio compuesto por macrófagos (a), células T (b) y células B (c) estaba reducido en los ratones del grupo liMOG. Asimismo, el área de desmielinización (d) era significativamente inferior en las muestras de ratones de este grupo, que también mostraron un grado de daño y degeneración axonal (e, f) menor que el observado en los grupos control.

APP: proteína precursora amiloide; li: grupo li; liMOG: grupo liMOG; NT: grupo no trasplantado; SMI-32: marcador de neurofilamentos defosforilados.

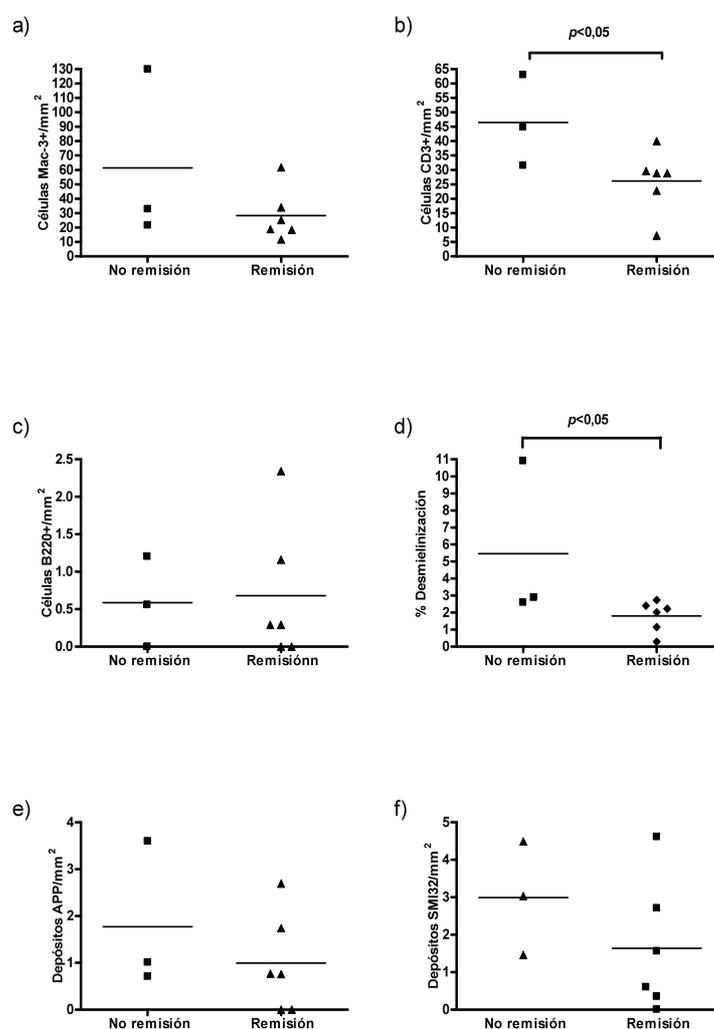
El área de desmielinización (Fig. 33d) era menor en el grupo liMOG ( $3,0\% \pm 3,1$ ) comparado con ambos grupos control (li:  $9,7\% \pm 2,9$  y NT:  $10,1\% \pm 4,2$ ;  $p < 0,01$  y

$p < 0,001$  respectivamente). El daño axonal agudo (Fig. 33e) estaba reducido en el grupo liMOG respecto al grupo li ( $1,3 \pm 1,2$  versus  $3,9 \pm 2,4$ ;  $p < 0,05$ ) pero no respecto al grupo NT ( $3,4 \pm 1,6$ ;  $p > 0,05$ ) y la degeneración de los axones (SMI-32) también disminuyó significativamente en el grupo liMOG ( $2,1 \pm 1,7$ ) respecto a los grupos li ( $5,3 \pm 2,3$ ;  $p < 0,05$ ) y NT ( $5,8 \pm 2,5$ ;  $p < 0,01$ ) (Fig. 33f). En la Figura 34 se muestra un ejemplo representativo de los cortes histológicos analizados para cada parámetro.



**Fig. 34- Ejemplo representativo del estudio histológico realizado.** Se cuantificó el área de desmielinización mediante tinción con LFB. El componente inflamatorio se cuantificó con marcadores específicos de macrófagos (Mac3), células T (CD3) y células B (B220). El daño axonal agudo se evaluó cuantificando los depósitos de APP y SMI-32 (neurofilamentos defosforilados). Cada columna corresponde a una muestra de un animal representativo de cada grupo. APP: proteína precursora amiloide; LFB: *luxol fast blue*

Cuando se analizaron los datos histopatológicos comparando los ratones en que habían remitido los signos clínicos de la EAE con aquellos que no experimentaron ningún tipo de remisión, dentro del grupo liMOG, también se observaron diferencias en el patrón de desmielinización e infiltración inflamatoria. Se encontraron niveles levemente reducidos de macrófagos (Fig. 35a) y significativamente reducidos de células T (Fig. 35b). El nivel de células B era similar (Fig. 35c), y por otro lado, como era de esperar, el grado de desmielinización estaba significativamente reducido en los animales en los que mejoró la puntuación clínica (Fig. 35d). El daño axonal (Fig. 35e, f) en los ratones que experimentaron algún tipo de remisión durante el seguimiento clínico se vio levemente disminuido, aunque las diferencias no eran estadísticamente significativas seguramente porque el tamaño de la muestra era insuficiente.



**Fig. 35- La remisión de los signos clínicos se corresponde con la mejoría histopatológica.** Los ratones que experimentaron remisión de los signos clínicos tenían un número menor de células CD3<sup>+</sup> en el infiltrado (b) así como un porcentaje menor de desmielinización (d). El número de macrófagos y linfocitos B (a, c) en el infiltrado, así como el daño axonal (e, f) no diferían entre los animales que habían remitido la EAE de los que no.

### 6.3- La presencia de anticuerpos específicos frente a MOG<sub>40-55</sub> no es predictiva de la evolución de la enfermedad

Se obtuvo suero de los ratones al final de cada experimento y se evaluó la presencia de anticuerpos IgG específicos frente al péptido encefalitogénico mediante la técnica de ELISA.

No se encontraron diferencias en la media de las *ratios* entre el grupo liMOG ( $12,3 \pm 14,8$ ) y los grupos li ( $9,2 \pm 10,1$   $p=0,425$ ) y NT ( $15,4 \pm 21,9$ ;  $p=0,589$ ) (Fig. 36a). En el grupo liMOG se detectaron anticuerpos específicos en el 79,2% de los ratones, un porcentaje similar al hallado en los grupos li (63,6%) y NT (75,0%). Además, entre los animales del grupo liMOG que experimentaron una remisión clínica y los que no tampoco se observaron diferencias (Fig. 36b), hecho que sugiere que la presencia de anticuerpos no influye de manera determinante en la evolución de la enfermedad.

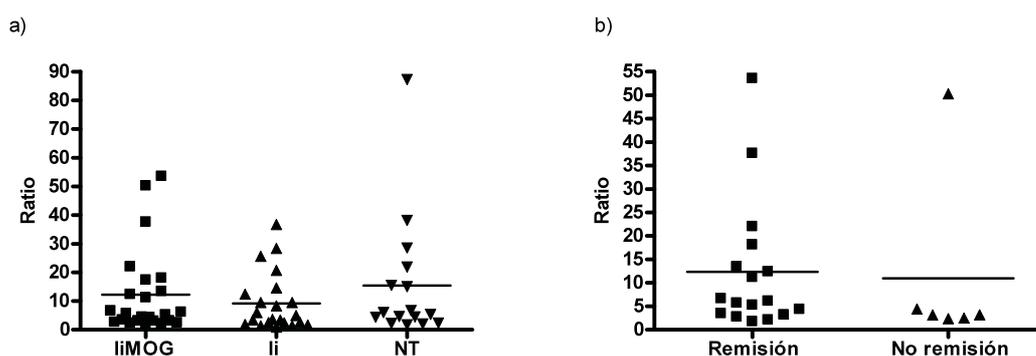


Fig. 36- Detección de anticuerpos anti-MOG<sub>40-55</sub> después del trasplante de la células de MO transducidas con el autoantígeno. a) No se observaron diferencias en la media de la *ratio* entre el grupo liMOG y los grupos control (li y NT). b) Dentro del grupo liMOG tampoco se observaron diferencias entre los animales que habían experimentado remisión de los signos clínicos y los que no.

### 6.4- Aumento de la producción de IL-5 e IL-10 en los ratones trasplantados con MO que expresaba el autoantígeno

Los esplenocitos de los ratones trasplantados que se sacrificaron a día 41 p.i. (experimento III) se cultivaron con el péptido MOG<sub>40-55</sub> durante 72 horas. Se analizó el patrón de citocinas secretadas al medio de cultivo mediante citometría de flujo. Las citocinas analizadas fueron las siguientes: GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL1- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17 y TNF- $\alpha$ .

## Resultados

Además, por la importancia que se les atribuye en la patogenia de la EAE, se analizó la frecuencia de esplenocitos específicos frente al péptido encefalitogénico que producían IFN- $\gamma$  e IL-17 mediante la técnica de ELISPOT.

Se hallaron diferencias significativas en las concentraciones de IL-5 e IL-10 y se observó una tendencia a la significación estadística en la producción de IL-4 (Tabla 6). En el grupo liMOG no se detectaron diferencias en la concentración de IL-5 e IL-10 entre los animales que habían experimentado remisión de la enfermedad y los que no se recuperaron (IL-5: 264,8 pg/ml  $\pm$  212,0 en los ratones con remisión y 158,8 pg/ml  $\pm$  85,7 en los ratones no recuperados,  $p=0,444$ ; IL-10: 104,7 pg/ml  $\pm$  58,8 en los ratones con remisión y 66,7 pg/ml  $\pm$  67,5 en los ratones no recuperados,  $p=0,411$ ), seguramente por ser el tamaño de la muestra insuficiente.

Tabla 6- Concentración de citocinas Th2 secretadas al medio de cultivo

	IL-4	IL-5	IL-6	IL-10
liMOG	60,4 $\pm$ 20,1	229,4 $\pm$ 180,9	128,6 $\pm$ 70,5	92,1 $\pm$ 60,5
li	39,3 $\pm$ 23,6	90,4 $\pm$ 75,0	94,7 $\pm$ 81,2	23,8 $\pm$ 33,2
Valor de $p$	0,058	<0,05	0,360	<0,05

La concentración de IL-5 e IL-10 está aumentada en los ratones trasplantados con MO transducida con el autoantígeno. La concentración está expresada en pg/ml y los datos se expresan como la media  $\pm$  DS. li: grupo li; liMOG: grupo liMOG.

Por otro lado, se detectaron niveles similares de citocinas pro inflamatorias en ambos grupos de ratones trasplantados (Tabla 7). No se observaron diferencias significativas en los niveles de IFN- $\gamma$  e IL-17. No se hallaron diferencias en la concentración de IFN- $\gamma$  en los cultivos de esplenocitos de los ratones del grupo liMOG respecto a los controles (Tabla 7) ni en los ratones que presentaron remisión de la enfermedad respecto a los que no habían presentado remisión dentro de este mismo grupo (3327,5 pg/ml  $\pm$  2821,9 *versus* 2180,2 pg/ml  $\pm$  1168,0 en los ratones no recuperados,  $p=0,531$ ). En este mismo sentido, el nivel de IL-17 en los ratones en los que se había observado remisión dentro del grupo liMOG (612,4 pg/ml  $\pm$  332,9) se encontraba ligeramente más elevado respecto a los ratones no recuperados (297,0 pg/ml  $\pm$  328,6;  $p=0,221$ ). Tampoco se hallaron diferencias significativas en la concentración de IL-6, citocina definida tanto como Th1 y Th2 y que recientemente se descrito como esencial en la diferenciación del subtipo celular Th17. En este apartado no se menciona el TNF- $\alpha$  ya que no se detectó este factor en ninguna de las muestras.

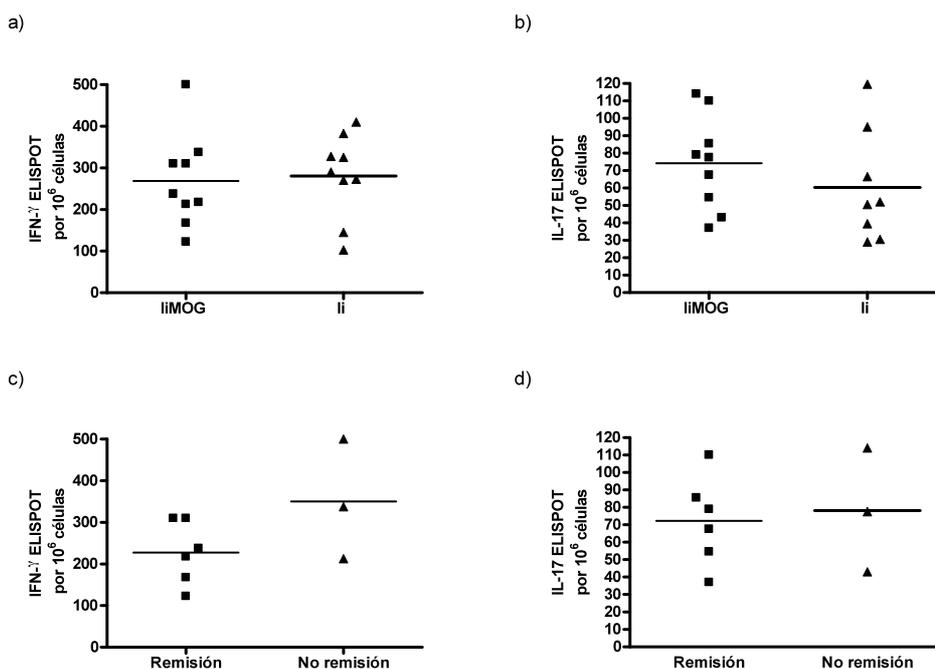
Tabla 7- Concentración de citocinas Th1/Th17 secretadas al medio de cultivo

	IL-1 $\alpha$	IL-2	IL-17	IFN- $\gamma$	GM-CSF
liMOG	20,14 $\pm$ 17,3	1826,8 $\pm$ 518,3	507,3 $\pm$ 348,0	2945,0 $\pm$ 2376,4	241,9 $\pm$ 180,8
li	18,0 $\pm$ 13,2	1518,4 $\pm$ 751,4	677,0 $\pm$ 743,7	2047,1 $\pm$ 1642,0	154,7 $\pm$ 98,2
Valor de <i>p</i>	0,774	0,326	0,544	0,365	0,222

No se hallaron diferencias significativas en los niveles de citocinas pro inflamatorias en ambos grupos de ratones trasplantados. La concentración está expresada en pg/ml y los datos se expresan como la media  $\pm$  DS.

li: grupo li; liMOG: grupo liMOG.

En concordancia con estos últimos resultados, no se observaron diferencias significativas entre los ratones del grupo liMOG y los del grupo li en la frecuencia de células antígeno específicas productoras de IFN- $\gamma$  (liMOG: 268,3  $\pm$  111,8; li: 280,6  $\pm$  101,0; *p*=0,627) e IL-17 (liMOG: 74,22  $\pm$  27,0; li: 60,3  $\pm$  32,1; *p*=0,248) (Fig. 37a y b, respectivamente).

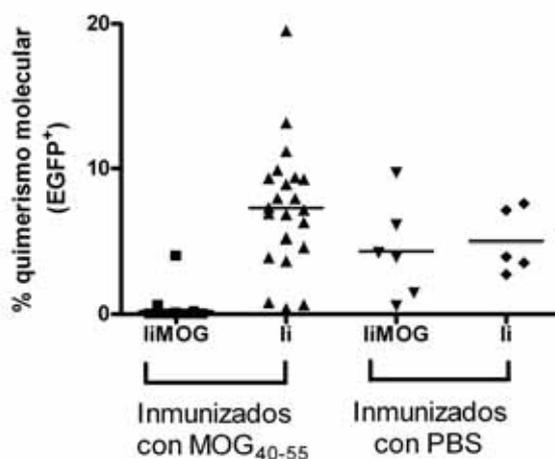


**Fig. 37- La frecuencia de células específicas productoras de IFN- $\gamma$  e IL-17 es similar en los grupos li e liMOG.** No se detectaron diferencias significativas en la frecuencia de células productoras de IFN- $\gamma$  (a) ni de IL-17 (b) entre los grupos liMOG e li. La frecuencia de células productoras de IFN- $\gamma$  era menor en los ratones recuperados respecto a los no recuperados dentro del grupo liMOG (c), una diferencia que no se observó para la IL-17 (d), si bien en ningún caso estas diferencias fueron estadísticamente significativas. Los resultados se presentan como la frecuencia de células antígeno específicas productoras de estas citocinas (número de células antígeno específicas por 10<sup>6</sup> esplenocitos).  
li: grupo li; liMOG: grupo liMOG.

En los ratones en los que habían remitido de la enfermedad dentro del grupo liMOG se observó una disminución con tendencia a la significación estadística en la frecuencia de células productoras de IFN- $\gamma$  respecto a los no recuperados (recuperados:  $227,5 \pm 75,4$  versus no recuperados:  $350 \pm 144,2$ ;  $p=0,123$ ) (Fig. 37c). Contrariamente, dentro de este grupo, la frecuencia de células productoras de IL-17 en los bazo de los ratones recuperados ( $72,25 \pm 25,4$ ) fue similar a la observada en los no recuperados ( $78,2 \pm 35,5$ ;  $p=0,779$ ) (Fig. 37d), teniendo en cuenta que el tamaño de la muestra era muy pequeño.

### 6.5- Ausencia de quimerismo molecular en los ratones trasplantados con MO que expresa el autoantígeno

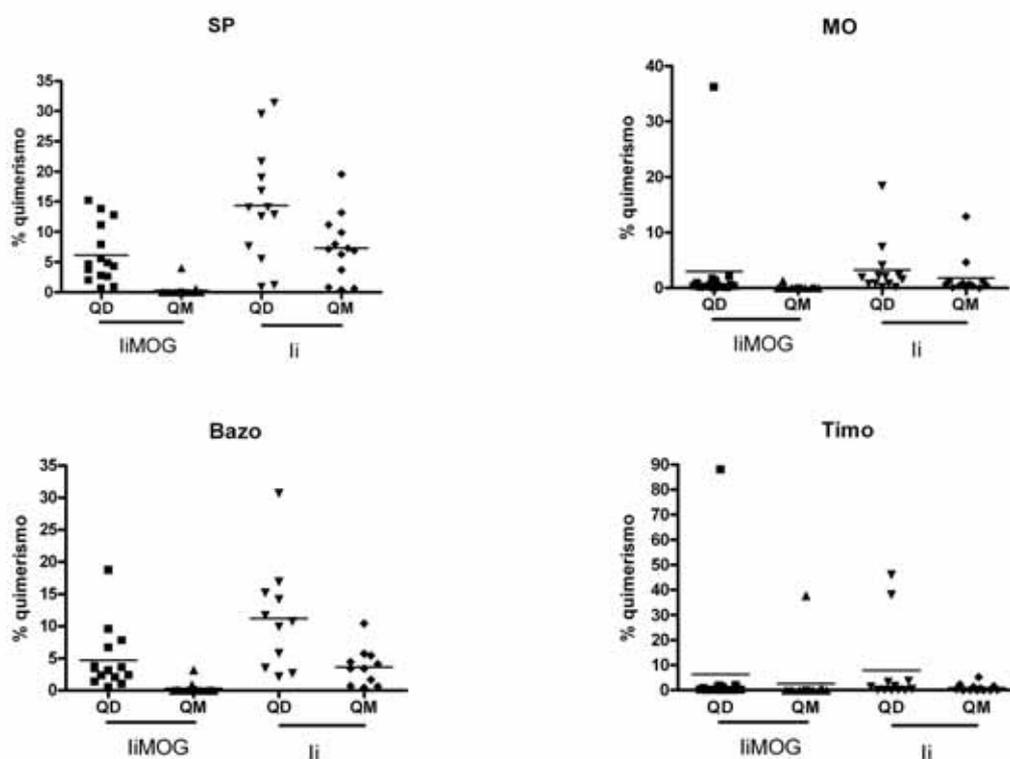
Un mes después del trasplante se analizó el quimerismo del donante y el quimerismo molecular en muestras de SP por citometría de flujo. A pesar de la mejoría clínica observada en los ratones del grupo liMOG, en la mayoría de ellos no se detectó quimerismo molecular ( $0,2\% \pm 0,8$ ; Fig. 38) aunque sí quimerismo del donante en todos los ratones ( $5,1\% \pm 4,2$ ). Por el contrario, los ratones del grupo li presentaban niveles detectables en todos los casos tanto de quimerismo del donante como molecular ( $14,3\% \pm 7,6$  y  $7,3\% \pm 4,3$  respectivamente; Fig. 38).



**Fig. 38- Ausencia de células transducidas en los ratones tratados con las células de MO transducidas con el vector liMOG.** El quimerismo molecular en la SP de los ratones del grupo liMOG inmunizados con MOG<sub>40-55</sub> era prácticamente inexistente. Este hecho no se observó en los ratones inmunizados con PBS del mismo grupo ni en los inmunizados con MOG<sub>40-55</sub> que recibieron células transducidas con el vector control (li).

Estos resultados, junto con los niveles similares de quimerismo hallados en los ratones control inmunizados con PBS en ausencia del péptido MOG<sub>40-55</sub> del grupo liMOG

(quimerismo molecular:  $4,4\% \pm 3,1$ ; quimerismo del donante:  $10,9\% \pm 5,5$ ) y del grupo li (quimerismo molecular:  $5\% \pm 3$ ; quimerismo del donante:  $11\% \pm 5,7$ ) (Fig. 38), sugieren la existencia de un rechazo específico de las células que expresan el transgén liMOG, muy probablemente debido a la respuesta inmune preestablecida en los ratones al haber sido inmunizados con el autoantígeno MOG<sub>40-55</sub>. También analizamos el quimerismo del donante y el molecular en los órganos hematopoyéticos de los ratones de los experimentos I y II. Los datos de quimerismo en SP se obtuvieron un mes después del trasplante de MO mientras que los del resto de tejidos hematopoyéticos (bazo, MO y timo) se obtuvieron al final de ambos experimentos (tres meses después del trasplante). Pudimos observar que, al igual que en SP, la mayoría de ratones del grupo liMOG no presentaba quimerismo molecular en los órganos hematopoyéticos, pero sí quimerismo del donante (Fig. 39). La mayoría de ratones del grupo li sí tenía quimerismo del donante y molecular en los diferentes órganos, aunque éste se encontraba casi ausente en el timo. Curiosamente, el ratón del grupo liMOG en el que se observó un quimerismo del donante y molecular más elevado en timo no experimentó ningún tipo de recuperación a lo largo del seguimiento clínico.

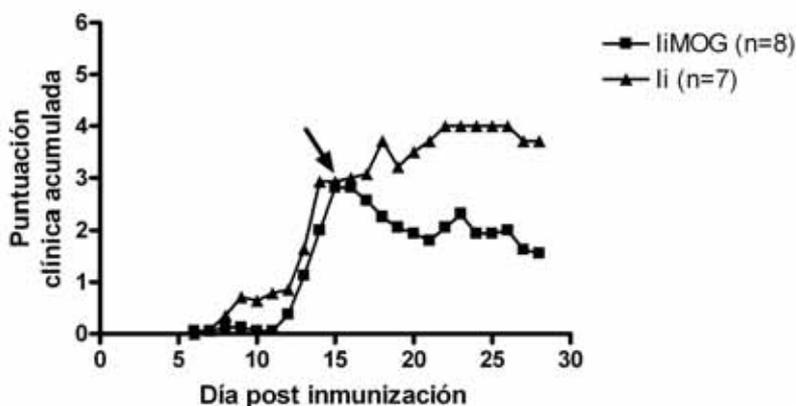


**Fig. 39- Quimerismo del donante y molecular en los diferentes tejidos hematopoyéticos.** Se halló quimerismo del donante pero no molecular en los diferentes tejidos hematopoyéticos de los ratones del grupo liMOG, y ambos quimerismos en la mayoría de ratones del grupo li. En el timo se observaron niveles muy bajos o indetectables de quimerismo en ambos grupos.  
li: grupo li; liMOG: grupo liMOG; QD: quimerismo del donante; QM: quimerismo molecular.

**6.6- Mejoría clínica de la enfermedad en ausencia de acondicionamiento**

Al observarse una mejoría clínica en los ratones del grupo liMOG a pesar de la ausencia de quimerismo molecular, hipotetizamos que el efecto terapéutico podría estar mediado por células que expresaban el autoantígeno (pues los animales control no mejoraban) pero sin que fuera necesario un injerto estable de éstas, por lo que quizás se podría prescindir del acondicionamiento parcialmente mieloablativo. Así, nos propusimos tratar la EAE infundiendo células de MO transducidas con el vector liMOG en ausencia de acondicionamiento cuando la mayoría de los animales ya presentaban signos clínicos de la enfermedad (día 15 p.i.).

En el seguimiento clínico de estos animales también se constató una mejoría en el grupo liMOG (Fig. 40), que tuvieron una menor puntuación clínica acumulada respecto a la del grupo control li ( $26,9 \pm 21$  versus  $47,6 \pm 6,8$  respectivamente;  $p < 0,05$ ). Tres de los 8 ratones del grupo liMOG (37,5%) experimentaron remisión de la enfermedad, y uno (12,5%) se recuperó completamente. Como en los experimentos anteriores en los que se utilizó acondicionamiento previo al trasplante, la recuperación empezó tempranamente, entre 2 y 5 días después de la infusión de las células transducidas. Por el contrario no se observó remisión en ningún ratón del grupo control li.

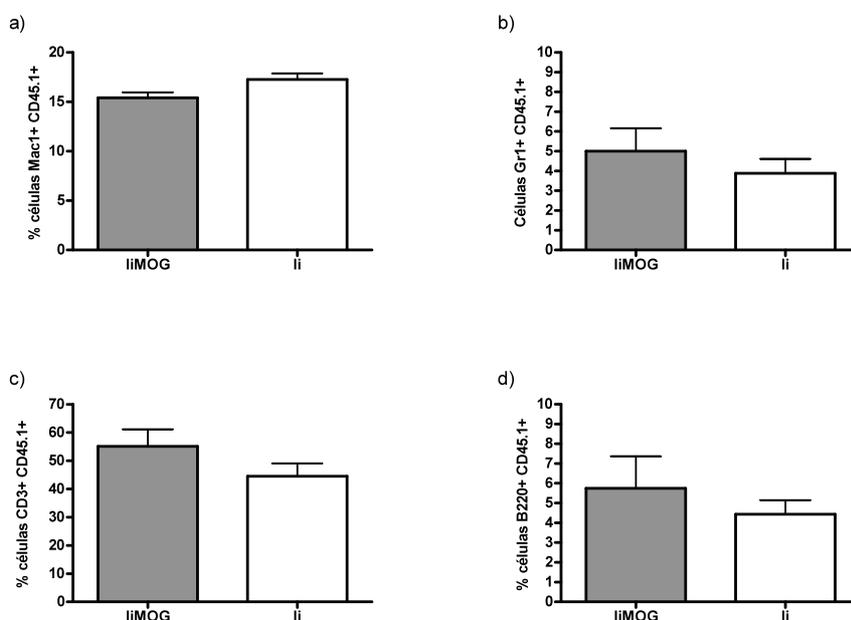


**Fig. 40- Recuperación de la EAE en ausencia de acondicionamiento.** Una vez establecida la enfermedad, se inyectaron por vía i.v.  $10^6$  células de MO transducida con los vectores liMOG o li sin acondicionamiento previo. La recuperación de los animales tratados con el autoantígeno empezó a observarse pocos días después de la infusión de las células transducidas. El gráfico representa la media de la puntuación clínica diaria para cada grupo experimental. La flecha indica el día de la infusión de las células de MO transducidas. li: grupo li; liMOG: grupo liMOG.

### 6.7- Contribución de las células del donante a la reconstitución hemopoyética tras el trasplante

Se investigó si ambos grupos de ratones trasplantados tenían un patrón similar de reconstitución hematopoyética a partir de las células del donante. Para ello se marcaron los esplenocitos de los ratones trasplantados con anticuerpos monoclonales para monocitos, granulocitos, células T y B, y se analizaron por citometría de flujo.

Los ratones trasplantados de ambos grupos presentaban un patrón similar de linajes a partir de las células derivadas del donante (CD45.1<sup>+</sup>) (Fig. 41). Estos resultados indican que en ambos grupos de receptores (liMOG e li) no hubo problemas de injerto, y que las células injertadas generaban una progenie multilinaje.



**Fig. 41- El trasplante de células de MO permitió el injerto multilinaje efectivo a partir de células del donante.** Se estudió la contribución de las células del donante a los diferentes linajes hematopoyéticos en los ratones de los grupos liMOG e li. Se cuantificó el porcentaje de células de estirpe mieloide (a y b), y linfocitos T (c) y B (d) derivadas de las células trasplantadas (CD45.1<sup>+</sup>). li: grupo li; liMOG: grupo liMOG.

### 6.8- Las células trasplantadas tienen un fenotipo fundamentalmente mieloide

La rápida mejoría observada en los ratones trasplantados con MO que expresaba el autoantígeno a pesar de la ausencia de quimerismo molecular en éstos, indicaría que las células con capacidad de repoblación hematopoyética podrían no tener ninguna

función en la creación de tolerancia y sugeriría la participación de células sin capacidad de repoblación que se habrían generado en el cultivo *ex vivo* de MO.

Para evaluar esta hipótesis se investigó el fenotipo de las células de MO cultivadas después de la transducción retroviral y antes del trasplante a los ratones receptores. La mayoría de las células expresaban los marcadores de superficie Mac1 (65,5-72,3%) y Gr1 (19,7-26,6%), y un porcentaje menor expresaban el marcador de células T CD3 (8,3-8,6%) indicando que en las condiciones de cultivo utilizadas se generan mayoritariamente células de estirpe mieloide, tal y como está descrito en la literatura (Bender et al. 1992; Smith et al. 1993).

**PARTE II. INFLUENCIA DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DEL TRANSGÉN EGFP EN LA INMUNOGENICIDAD DE LAS CÉLULAS TRANSDUCIDAS**

**1- AUSENCIA DE QUIMERISMO MOLECULAR EN LOS RATONES TRASPLANTADOS CON MO TRANSDUCIDA CON EL VECTOR SF1-EGFP**

En los dos experimentos preventivos antes citados usamos el vector SF1-EGFP como vector control ya que todavía no disponíamos del SF91-li-IRES-EGFP. Este vector y la línea productora de éste se había obtenido anteriormente en el laboratorio (Limon et al. 1997) y se habían usado anteriormente para realizar experimentos *in vivo* (Puig et al. 2002).

Tres semanas después del trasplante de MO y antes de la inducción de la EAE, analizamos la presencia de quimerismo en las muestras de SP. Observamos que, en la mayoría de los ratones trasplantados con MO transducida con el vector SF1-EGFP no se detectaba quimerismo molecular a pesar de que casi todos presentaban quimerismo del donante (Tabla 8).

**Tabla 8- Ausencia de quimerismo molecular en los ratones trasplantados con MO transducida con el vector SF1-EGFP**

<b>Grupo</b>	<b>QD</b>	<b>QM</b>
<b>Bu-IRES (n=25)</b>	6,98%± 9,22*	3,69% ± 6,03**
<b>Bu-LTR (n=15)</b>	3,64% ± 5,48*	0,02% ± 0,05**
<b>Valor de p</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,0001</b>

Se excluyeron del análisis los ratones con fallo de injerto.

Bu-IRES: grupo de ratones acondicionados con busulfán y trasplantados con MO transducida con el vector SF91-liIMOG-IRES-EGFP; Bu-LTR: grupo de ratones acondicionados con busulfán y trasplantados con MO transducida con el vector SF1-EGFP; QD: quimerismo del donante (CD45.1); QM: quimerismo molecular (EGFP).

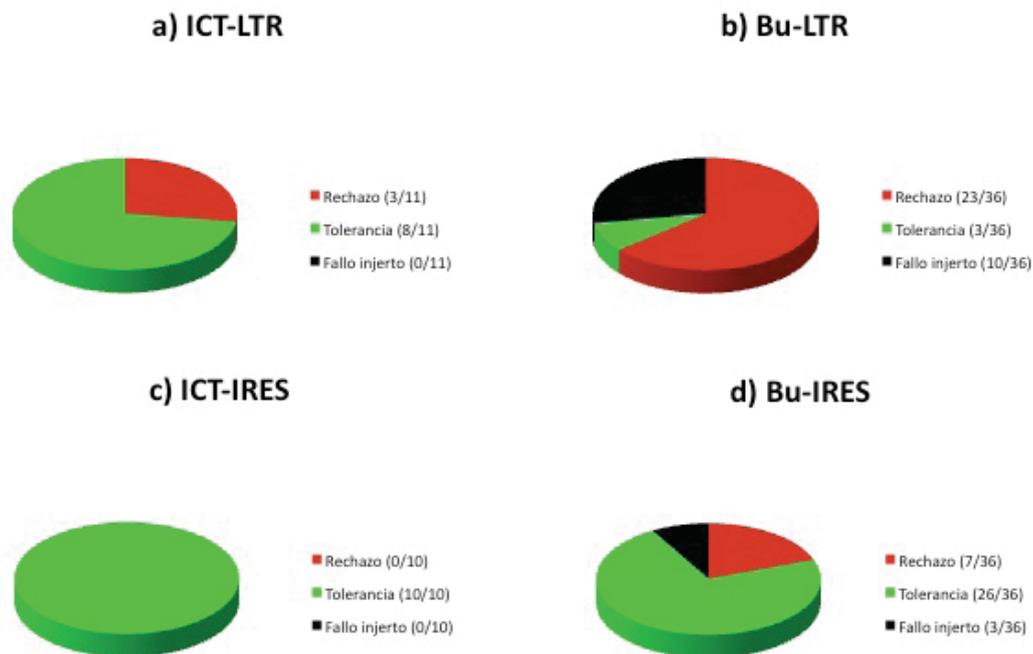
Este rechazo o ausencia de las células que expresaban el vector SF1-EGFP no la habíamos observado en experimentos anteriores en los que se había usado la ICT (tanto a dosis letales como a dosis subletales de 3-4 Gy) para acondicionar a los receptores. Por otra parte, el quimerismo molecular también se observaba en animales acondicionados con busulfán cuando el vector usado era el SF91-liIMOG-IRES-EGFP (Tabla 8). Así, hipotetizamos que la combinación de una pauta de acondicionamiento con poca capacidad inmunosupresora y el hecho que el nivel de expresión de la EGFP

se ve atenuada en estos vectores bicistrónicos, al estar dirigida por la secuencia IRES, podrían ser determinantes en el rechazo específico de las células transducidas con el vector SF1-EGFP.

Con el objetivo de corroborar esta hipótesis se diseñaron dos experimentos prospectivos, que incluían el uso de dos regímenes de acondicionamiento distintos (3-4 Gy de ICT y 2 x 20 mg/kg de busulfán los días 3 y 2 previos al trasplante) antes de infundir las células de MO transducidas con los vectores SF1-EGFP (grupos que denominamos LTR) y SF91-liMOG-IRES-EGFP (grupos IRES).

Usando la ICT como régimen de acondicionamiento, en la práctica totalidad de los ratones trasplantados con MO transducida con el vector bicistrónico (IRES) se observó quimerismo molecular estable, lo que sugería que se había inducido tolerancia frente a la EGFP. Sin embargo, tras el trasplante de MO transducida con el vector monocistrónico (LTR), en un 27,3% de los receptores no se detectó la presencia de células que expresaran la EGFP ( $p=0,214$ ; Fig. 42a y c). Por otro lado, la ausencia de quimerismo molecular cuando se acondicionaba a los ratones con busulfán era claramente mayoritario en el grupo LTR, mientras que en el grupo IRES se mantuvo la expresión de la EGFP en 26 de los 33 ratones trasplantados con injerto hematopoyético del donante (78,8%;  $p<0,001$ ; Fig. 42b, d). La Figura 42 recoge los resultados obtenidos retrospectivamente (experimentos I y II de tolerancia preventiva en EAE) y los obtenidos en los dos experimentos prospectivos diseñados expresamente para demostrar nuestra hipótesis.

A pesar que en 3 de los 26 ratones del grupo Bu-LTR que sí presentaban injerto de las células del donante se pudo detectar la presencia de células transducidas, todos ellos tenían niveles inferiores al 0,2% de quimerismo molecular, unos porcentajes significativamente inferiores a los del resto de grupos (Tabla 9).



**Fig. 42- Mayor rechazo de las células transducidas en los grupos LTR.** Se consideró rechazo cuando no se detectaba quimerismo molecular pero sí del donante, tolerancia cuando se detectaban ambos quimerismos y fallo del injerto cuando no se detectaba ninguno de los dos. En todos los casos las proporciones corresponden a la presencia o ausencia de quimerismo molecular en SP o en MO analizado 21-31 días después del trasplante de MO. Los datos corresponden a los resultados obtenidos en los cuatro experimentos realizados.

Bu-IRES: grupo acondicionado con busulfán y trasplantado con células de MO transducidas con el vector SF91-liMOG-IRES-EGFP; Bu-LTR: grupo acondicionado con busulfán y trasplantado con células de MO transducidas con el vector SF1-EGFP; ICT-IRES: grupo acondicionado con 3-4 Gy de ICT y trasplantado con células de MO transducidas con el vector SF91-liMOG-IRES-EGFP; ICT-LTR: grupo acondicionado con 3-4 Gy de ICT y trasplantado con células de MO transducidas con el vector SF1-EGFP.

**Tabla 9- Niveles bajos o inexistentes de quimerismo molecular en el grupo Bu-LTR**

Grupo	n	Media ± DS
<b>ICT-IRES</b>	10	2,98% ± 3,90**
<b>ICT-LTR</b>	11	5,49% ± 7,89*
<b>Bu-IRES</b>	33	4,70% ± 11,39**
<b>Bu-LTR</b>	26	0,01% ± 0,04

Se comparó la media del quimerismo molecular del grupo Bu-LTR respecto a las del resto de grupos experimentales. Se excluyeron del análisis aquellos ratones que presentaban fallo del injerto.

\* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,0001$

**2- MAYOR INTENSIDAD EN LA EXPRESIÓN DE LA EGFP CON EL VECTOR SF1-EGFP**

Dado que la diferencia más obvia entre los dos vectores es que dan lugar a niveles de expresión de EGFP muy distintos, hipotetizamos que la diferencia en el nivel de expresión podría ser el principal responsable de los distintos resultados observados. Para investigar esta hipótesis, al final del cultivo de MO y antes de trasplantar las células a los receptores se evaluó la eficiencia de transducción así como la MFI. La expresión del vector SF1-EGFP (*ratio* de la MFI: 1056,0 ± 809,7) era tres veces superior a la obtenida con el vector SF91-liMOG-IRES-EGFP (*ratio* de la MFI: 334,9 ± 303,2;  $p < 0,05$ ) en los cuatro experimentos (Tabla 10), siendo la MOI utilizada en la transducción y el porcentaje de células de MO transducida en el momento del trasplante similar en ambos casos (IRES: 23,4% ± 10,72; LTR: 25,7% ± 14,6).

**Tabla 10- El nivel de expresión de la EGFP es superior en las células de MO transducida con el vector SF1-EGFP**

Experimento	<i>Ratio</i> MFI	<i>Ratio</i> MFI
	IRES	LTR
1	95,5	445,7
2	50,4	365,8
3	570,6	1335,0
4	622,0	2076,0

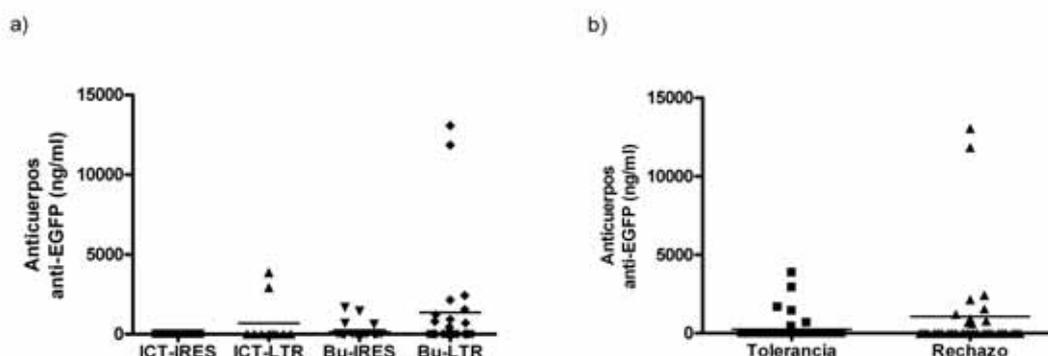
La *ratio* o relación de la MFI se calculó en relación a la MFI del control negativo. Los datos corresponden a los dos experimentos de tolerancia preventiva en EAE y a los dos experimentos prospectivos diseñados para esta parte del trabajo.  
IRES: vector SF91-liMOG-IRES-EGFP; LTR: vector SF1-EGFP.

**3- EL DESARROLLO DE UNA RESPUESTA HUMORAL ANTI-EGFP NO ES PREDICTIVA DEL RECHAZO INMUNOLÓGICO**

Se analizó la concentración de anticuerpos de clase IgG anti-EGFP en el suero de los ratones 4-8 semanas después del trasplante mediante ELISA. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas cuando se comparaban las concentraciones halladas en los grupos de ratones tratados con ICT ( $p=0,481$ ); ninguno de los ratones trasplantados con el vector SF191-liMOG-IRES-EGFP desarrolló anticuerpos anti-EGFP (0/10) y solamente 2 de 11 ratones trasplantados con células transducidas con el vector SF1-EGFP desarrollaron anticuerpos específicos frente a la EGFP a niveles detectables (Fig. 43a). De los ratones acondicionados con busulfán, 4 de 33 del grupo IRES (Bu-IRES) desarrollaron anticuerpos anti-EGFP, frente a 10 de 26 en el grupo

Bu-LTR ( $p < 0,05$ ). Las diferencias en las concentraciones de anticuerpos anti-EGFP no resultaron significativas entre los grupos tratados con busulfán, aunque se observó una tendencia a la significación estadística ( $p = 0,063$ ).

En la Figura 43b se muestra la relación entre el desarrollo de anticuerpos y el rechazo de las células transducidas. Seis de 47 ratones (12,8%) que sí presentaban quimerismo molecular desarrollaron anticuerpos anti-EGFP independientemente del acondicionamiento recibido, una proporción que no fue significativamente diferente en aquellos que rechazaron específicamente las células transducidas (30,3%; 10/33;  $p = 0,087$ ). Tampoco se observaron diferencias cuando se compararon las medias de las concentraciones entre los animales que no rechazaron y los que sí (Tolerancia:  $239,5 \pm 764,6$  ng/ml *versus* Rechazo:  $1069,0 \pm 3010,0$  ng/ml;  $p = 0,177$ ).

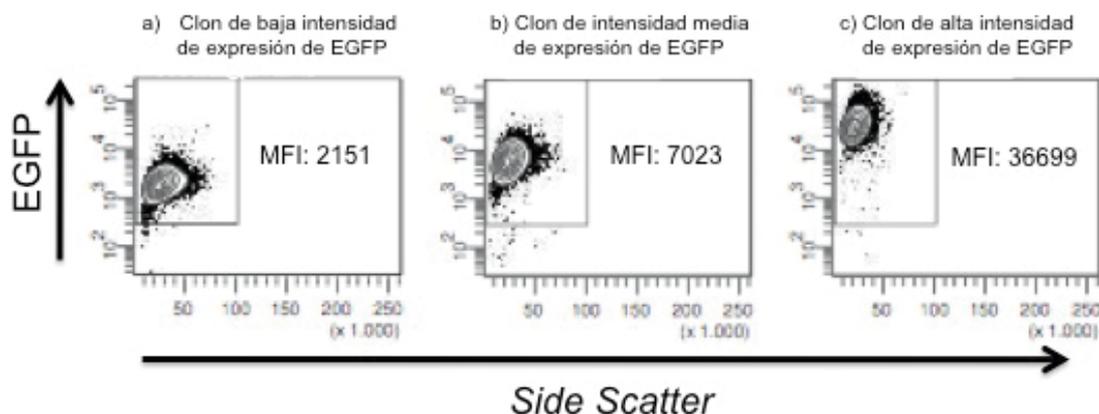


**Fig. 43- Detección de anticuerpos anti-EGFP.** a) La concentración de anticuerpos no difiere entre los diferentes grupos. b) No se observó relación entre la aparición de anticuerpos anti-EGFP y el rechazo de las células transducidas. Se excluyeron del análisis los ratones que presentaron fallo de injerto. Bu-IRES: grupo acondicionado con busulfán y trasplantado con células de MO transducidas con el vector SF91-liMOG-IRES-EGFP; Bu-LTR: grupo acondicionado con busulfán y trasplantado con células de MO transducidas con el vector SF1-EGFP; ICT-IRES: grupo acondicionado con 3-4 Gy de ICT y trasplantado con células de MO transducidas con el vector SF91-liMOG-IRES-EGFP; ICT-LTR: grupo acondicionado con 3-4 Gy de ICT y trasplantado con células de MO transducidas con el vector SF1-EGFP.

#### **4- RESPUESTA INMUNE CELULAR FRENTE A INJERTOS CON ELEVADA EXPRESIÓN DE EGFP**

Tras no poder demostrar la influencia de una respuesta humoral en el presumible rechazo de las células transducidas, se quiso demostrar la participación de una respuesta inmune celular frente a la EGFP cuando ésta se expresa a niveles altos. Previo acondicionamiento con busulfán, los ratones se trasplantaron con  $0,5 \times 10^6$  células de MO transducidas con uno u otro vector, o no transducidas. Se sacrificaron a los 10 días y se obtuvieron los esplenocitos para realizar la técnica de ELISPOT con el

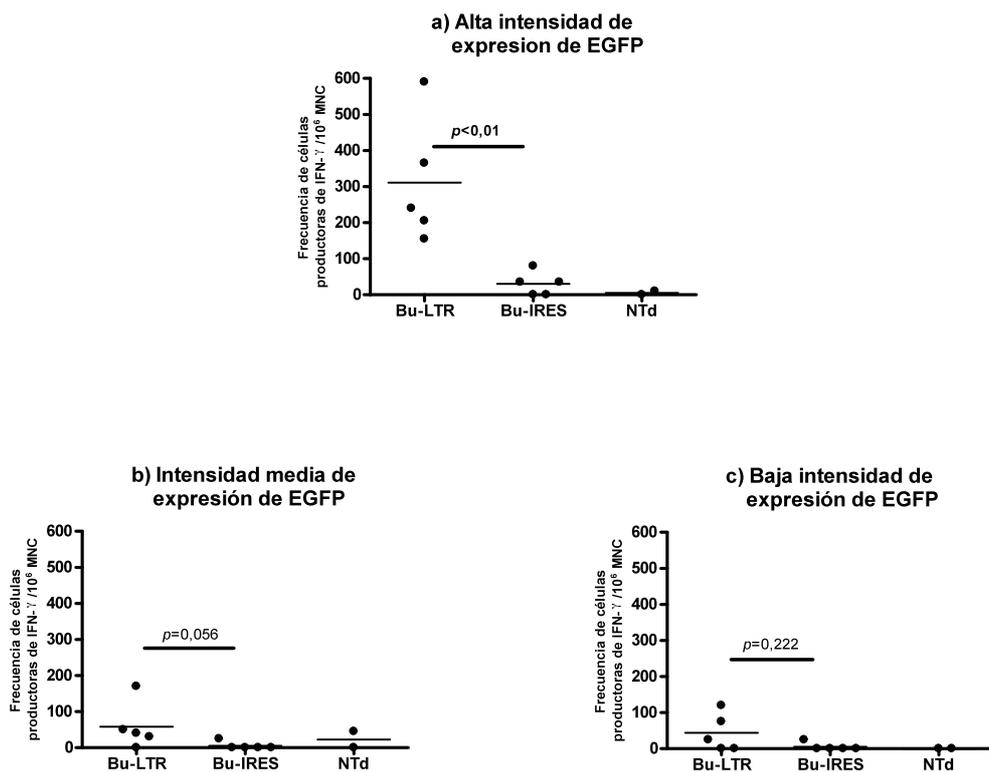
fin de detectar células productoras de IFN- $\gamma$ . Como células presentadoras de antígeno se usaron clones de la línea celular singénica EL4 expresando la EGFP a diferentes intensidades (Fig. 44), con la finalidad añadida de saber si la respuesta celular *in vitro* podía variar en función del nivel de expresión del transgén.



**Fig. 44 – Intensidad de fluorescencia de los tres clones de la línea celular EL4 que expresaban diferentes intensidades de EGFP.** Como células presentadoras de antígeno se usaron tres clones de la línea celular EL4 que expresaban el transgén a distintos niveles de intensidad.

La frecuencia de esplenocitos productores de IFN- $\gamma$  fue significativamente superior en los ratones trasplantados con células de MO transducidas con el vector SF1-EGFP (Fig. 45a) tras enfrentarlos al clon de la línea celular EL4 que expresaba con mayor intensidad la EGFP, mientras que no se hallaron diferencias significativas entre ambos grupos cuando éstos se enfrentaron a clones de EL4 de intensidad media y baja (Fig. 45b, c).

Estos resultados demuestran la inducción de respuestas inmunes celulares específicas en ratones sometidos a pautas de acondicionamiento parcialmente mieloablativas y poco inmunosupresoras y trasplantados con células de MO con alta expresión del transgén EGFP.



**Fig. 45-** Mayor frecuencia de células productoras de IFN- $\gamma$  en esplenocitos de ratones trasplantados con células de MO expresando el vector SF1-EGFP y enfrentados *in vitro* a células presentadoras (EL4 transducidas) con mayor intensidad de expresión de la EGFP. Se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos cuando la expresión de la EGFP era más intensa (a), mientras que las diferencias se hacían menos evidentes cuanto más débil era la intensidad de expresión del transgén (b y c).

Bu-IRES: grupo acondicionado con busulfán y trasplantado con células de MO transducidas con el vector SF91-liMOG-IRES-EGFP; Bu-LTR: grupo acondicionado con busulfán y trasplantado con células de MO transducidas con el vector SF1-EGFP; NTd: grupo acondicionado con busulfán y trasplantado con células de MO sin transducir.