



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Estudio de los mecanismos terapéuticos en la inducción de tolerancia inmunológica en un modelo animal de esclerosis múltiple

Alba Gómez Morago

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Esta tesis ha sido realizada en el Vall Hebron Institut de Recerca (VHIR),  
Hospital de la Vall d'Hebron, dentro del Programa de Doctorado en Biomedicina de la  
Universidad de Barcelona (UB)

## **Estudio de los mecanismos terapéuticos en la inducción de tolerancia inmunológica en un modelo animal de esclerosis múltiple**

Memoria presentada por Alba Gómez Morago para optar al grado de Doctor por la  
Universidad de Barcelona

Directores de Tesis:

Dr. Jordi Barquinero Máñez

Dra. Carmen Espejo Ruiz

Tutor de Tesis:

Dr. Thomas Stratmann

Doctoranda:

Alba Gómez Morago

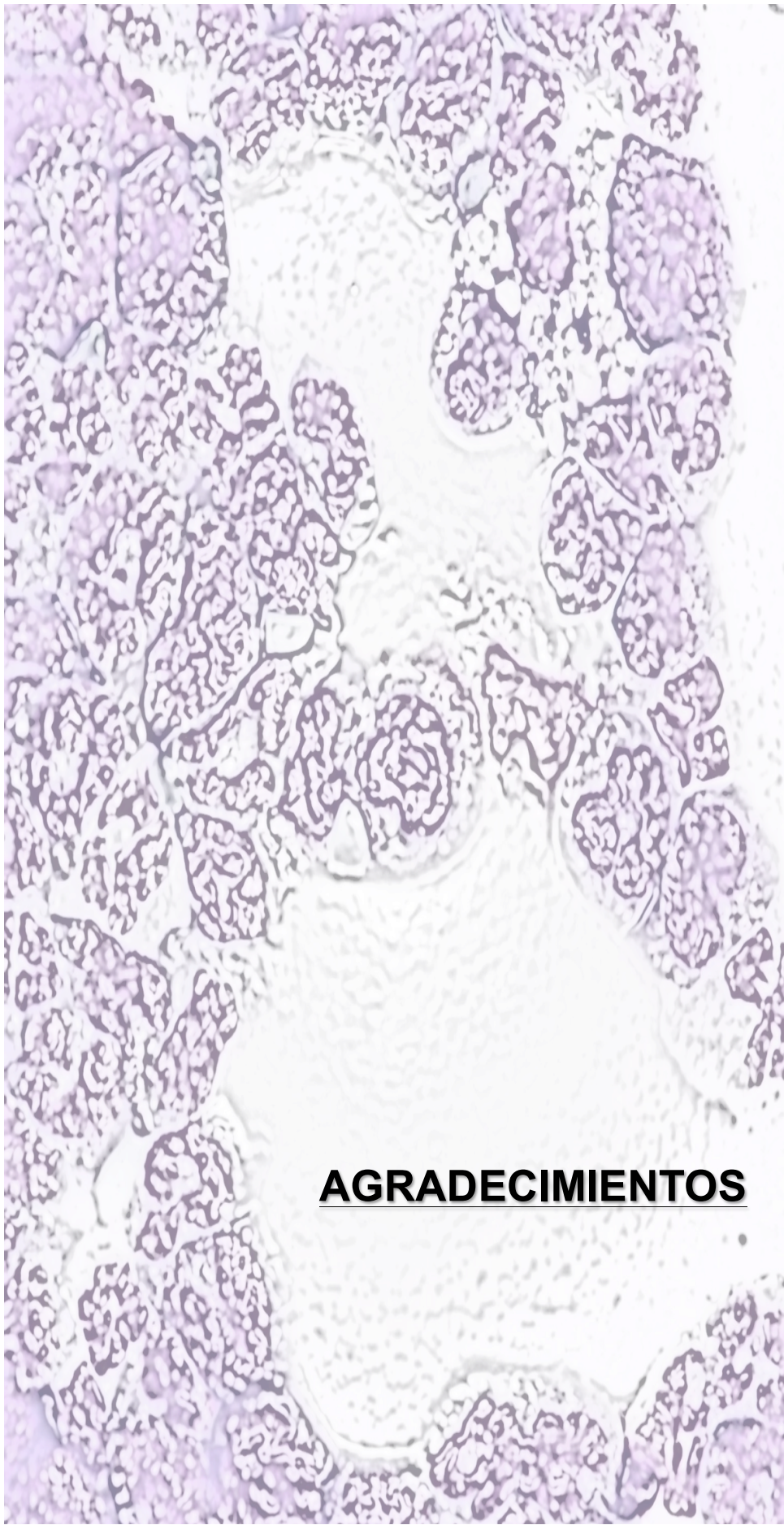
Barcelona 2015



A mis dos estrellas del cielo, mi padre y mi  
abuela, que siempre iluminan mi camino

Felisa y Alfonso





**AGRADECIMIENTOS**



Durante todo el tiempo que he dedicado a mi tesis doctoral, ha habido muchas personas que han participado de una forma más directa o espiritual a las cuales no puedo hacer otra cosa que agradecerles todo su tiempo, el esfuerzo que han dedicado y las ánimos y su apoyo para que no decayera en el intento.

En primer lugar quiero agradecerle a Jordi Barquinero el haber confiado en mí para realizar este proyecto y haberme dado la oportunidad de iniciar mi carrera profesional en la ciencia. También quiero agradecer a Carmen Espejo, por su implicación en el proyecto y en la tesis y por sus consejos, tanto a nivel científico como personales. A ambos os quiero agradecer todo el esfuerzo que habéis puesto para que esta tesis fuera posible, sobre todo en el tramo final.

También quiero agradecer a Ramón Gimeno, por sus aportaciones científicas a esta tesis, y por las conversaciones filosóficas sobre las MDSCs.

A Francisco Vidal, por su ayuda sobre todo en la parte molecular, que aunque no se vea reflejado en esta tesis, sí que ha sido un periodo importante durante mi estancia en el laboratorio, y por dar soporte informático a todo el laboratorio.

A todas las chicas y chico del laboratorio, a Herena, por ser la que nos ha ensañado a todos los que hemos ido pasando por el laboratorio, he aprendido muchísimo de ti y tienes una paciencia digna de admirar. A Sonia, por los momentos compartidos tanto dentro como fuera del laboratorio, los buenos días de los lunes y los ratos de sala de cultivos y estabulario compartidos. A Rebeca, por ser la constancia personificada, por ayudarme siempre que necesitaba células del tanque de nitrógeno y por tus empanadas. A Melanie, por los momentos "románticos" en la sala de cultivos. A Lorena, la alegría del laboratorio, por enseñarme a secuenciar y leer las secuencias y por tus momentos únicos y anécdotas mil. A Irene, por los sábados compartidos en el laboratorio, y por ser la guía de ocio de todos nosotros, aun admiro como siempre tienes algún sitio para proponer para cenar o comer. A Luis, por su levaduras que me ocupaban el orbital de bacterias pero sobre todo por sus canciones ingeniosas. A Sergio y Silvia, con los que

he compartido algunos de los conocimientos que he adquirido del resto del equipo y por su ayuda en los últimos días de laboratorio, sobre todo a Silvia que aun estando yo fuera del laboratorio me a ayudado mucho en datos que he ido necesitando.

No puedo dejarme a mi segundo laboratorio, Grupo de Neuroinmunología Clínica, creo que he pasado el mismo tiempo arriba que abajo. A Mireia, Esther, Nuria, Carme, Sunny, Nico, Zoraida, Marta, por dejarme que colonizara el citómetro y el contador celular.

A María José, que no solo has sido una compañera de laboratorio y de tesis, sino que también eres una gran amiga, y para mí es un placer que haya estado a mi lado en muchos momentos de mi vida.

A Alba y Vanesa, por todas las aventuras compartidas, gracias por el apoyo que me habéis dado, sé que siempre estáis ahí.

A Diana, compañera de trabajo y amiga, por hacerme de psicóloga y motivarme en los momentos más flojos.

A mis amigos, Desi e Iván, por dejarme que seáis como mis hermanos, y compartir con vosotros muchos momentos importantes de vuestras vidas.

A mi familia, mis tíos Félix, M<sup>a</sup> Ángeles, Esther, mis primos Dani, Marc, Aida, Ruth, que siempre me habéis está apoyando en todas las decisiones que he ido tomando a lo largo de mi vida.

A mi familia política, Laly, Jesús, Dani, Mónica, Fani y al chiquitin de la familia, Evan, por acogerme como una más de la familia, y por los grandes momentos compartidos y los que tienen que venir.

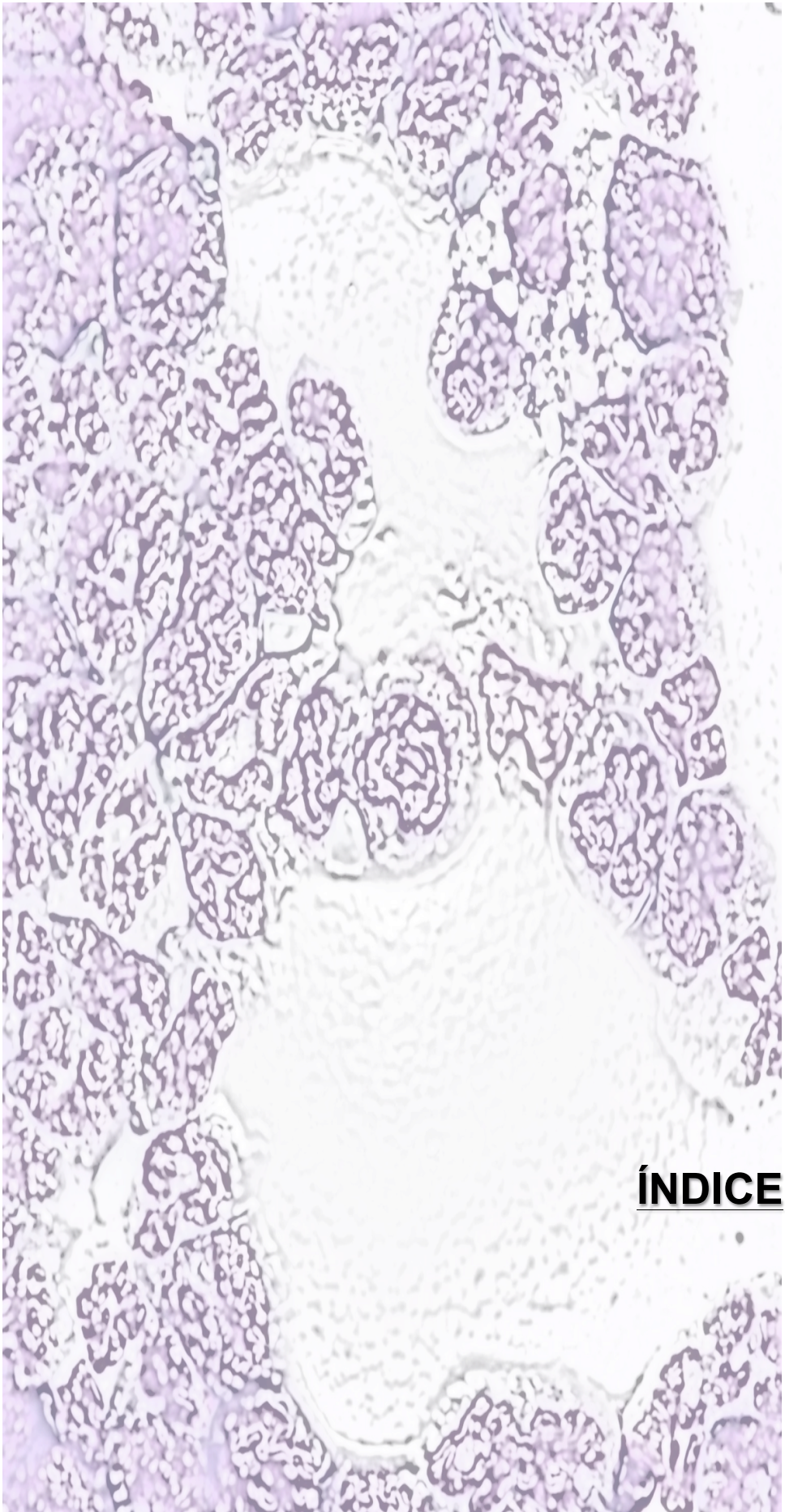
A mi madre, Vicky, por hacer de madre y amiga, poner el oído y el hombro siempre que lo he necesitado, sabes que eres mi gran apoyo y mi inspiración como mujer y madre.

A mi amigo, compañero y amor, Marcos, por estar siempre ahí, saber sacarme una sonrisa siempre que lo he necesitado y por hacerme una de las personas más felices de este mundo.

A mi pequeñaja, Valentina, tu eres los más grande que jamás me ha pasado, gracias por llenar de alegría y vitalidad nuestras vidas.

A mis dos estrellas del cielo, mi abuela Felisa, que con su dulzura me hacía olvidarme de todo lo demás. Y mi padre, Alfonso, al que solo puedo agradecer todo lo que me enseñó para que hoy sea la persona que soy, con el que me hubiera gustado poder compartir este momento y otros que han sido importantes para mí, pero que sé que desde ahí arriba me estás viendo y dándome tu apoyo.





## **ÍNDICE**



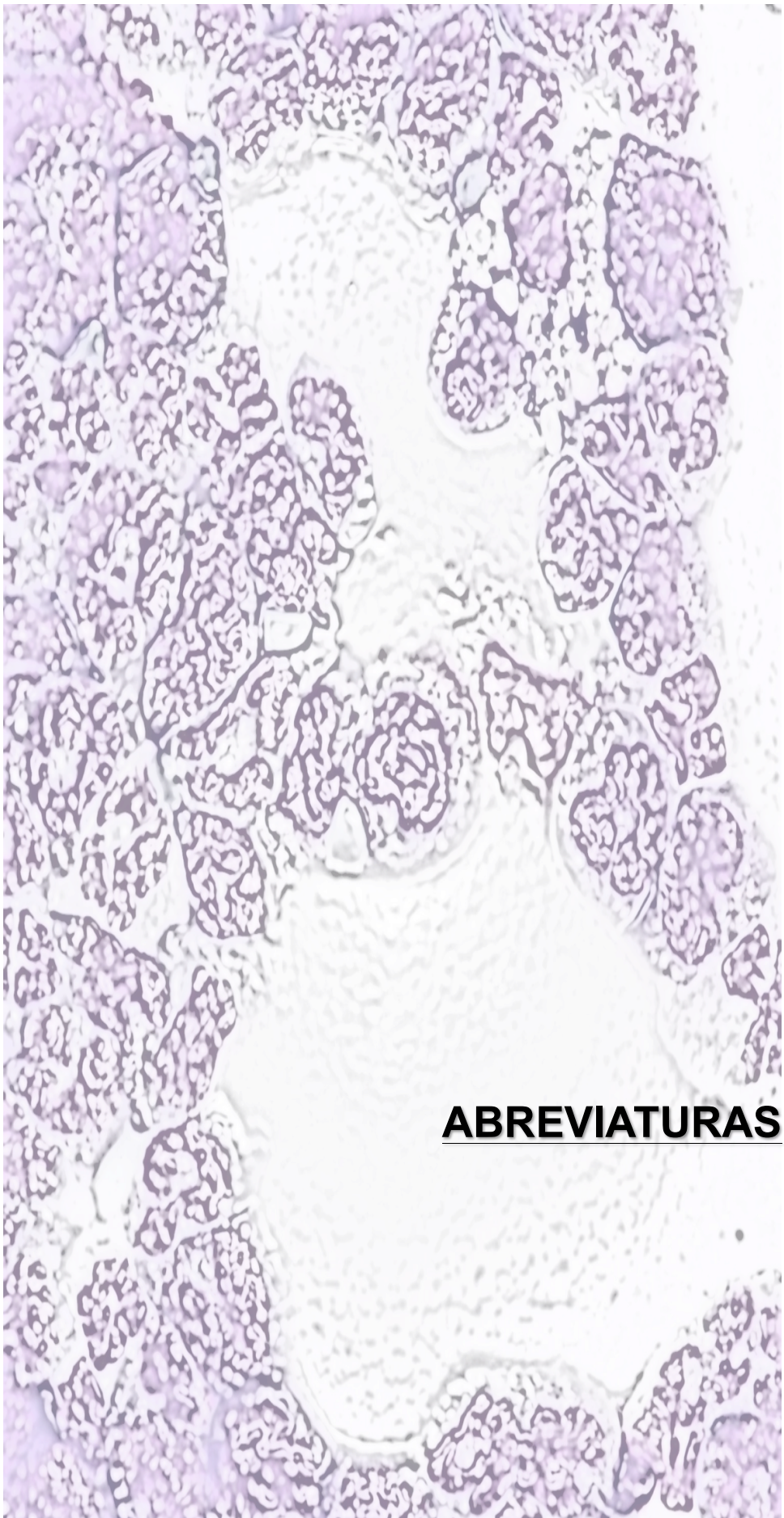
## **ÍNDICE**

<b><u>Abreviaturas</u></b> .....	<b>17</b>
<b><u>Presentación</u></b> .....	<b>25</b>
<b><u>Introducción</u></b> .....	<b>29</b>
<b>1. El sistema hematopoyético</b> .....	<b>31</b>
1.1. El trasplante hematopoyético.....	34
<b>2. Terapia génica hematopoyética</b> .....	<b>37</b>
2.1 Herramientas de transferencia génica.....	39
2.2. Vectores retrovirales.....	42
2.3. Ensayos clínicos de terapia génica hematopoyética.....	50
2.4. Riesgos de la terapia génica.....	51
2.5. Terapia génica y respuesta inmune .....	53
<b>3. Tolerancia inmunológica</b> .....	<b>54</b>
3.1. Mecanismos de tolerancia.....	55
3.2. Presentación de antígenos .....	61
3.3. Autoinmunidad y pérdida de tolerancia .....	66
<b>4. Células mieloides supresoras</b> .....	<b>67</b>
<b>5. Células madre mesenquimales</b> .....	<b>72</b>
<b>6. Esclerosis múltiple</b> .....	<b>73</b>
6.1. La encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) .....	75
<b><u>Hipótesis</u></b> .....	<b>87</b>
<b><u>Objetivos</u></b> .....	<b>91</b>
<b><u>Material y métodos</u></b> .....	<b>95</b>
<b>1. Vectores retrovirales</b> .....	<b>97</b>
<b>2. Líneas celulares productoras de vectores retrovirales</b> .....	<b>98</b>
<b>3. Transducción de células hematopoyéticas</b> .....	<b>98</b>

3.1. Ratones.....	98
3.2. Obtención de células de la médula ósea .....	99
3.3. Transducción de las células de la médula ósea .....	100
3.4. Recuperación de las células de médula ósea cultivadas.....	103
<b>4. Análisis fenotípico por citometría de flujo .....</b>	<b>103</b>
4.1. Eficiencia de transducción.....	104
4.2. Análisis fenotípico de las células hematopoyéticas.....	104
4.3. Análisis fenotípico de la población de Células mieloides supresoras.....	107
4.4. Análisis fenotípico de la población de Células madre mesenquimales .....	107
<b>5. Tinción celular de May-Grünwald Giemsa.....</b>	<b>108</b>
<b>6. Análisis bioquímicos .....</b>	<b>108</b>
6.1. Determinación de la actividad arginasa .....	108
6.2. Cuantificación de nitritos.....	111
<b>7. Inducción del modelo no Remitente de EAE y seguimiento clínico.....</b>	<b>111</b>
<b>8. Obtención de tejidos y células .....</b>	<b>112</b>
8.1. Obtención de los tejidos.....	112
8.2. Obtención de los esplenocitos.....	112
<b>9. Ensayo de supresión de la proliferación de las células T .....</b>	<b>113</b>
<b>10. Infusión de células: abordaje preventivo y terapéutico.....</b>	<b>114</b>
<b>11. Análisis de las poblaciones de células T reguladoras por citometría de flujo .....</b>	<b>115</b>
11.1. Análisis de la población nTreg en esplenocitos .....	115
11.2. Análisis de la población de células reguladoras Tr1.....	116
<b>12. Análisis, separación celular y valoración de los datos citométricos.....</b>	<b>118</b>
<b>13. Análisis estadísticos.....</b>	<b>121</b>
<b><u>Resultados</u> .....</b>	<b>123</b>

1. Determinación del fenotipo de la médula ósea transducida ..	125
2. Análisis fenotípico de las poblaciones candidatas. ....	126
3. Actividad arginasa-1 y producción de nitritos en las distintas poblaciones de células mieloides. ....	130
4. Análisis de la capacidad supresora de la médula ósea y de las subpoblaciones células mieloides supresoras .....	130
5 - La IL-3 juega un papel importante en la generación de células mieloides. ....	132
6- La infusión de células de médula ósea transducidas de forma preventiva mejora el curso clínico de la EAE .....	136
7- Las células mieloides supresoras están implicadas en la mejora clínica de la EAE .....	139
7.1 - Aumento de la población de células Treg en los ratones tratados con células transducidas con el autoantígeno. ....	141
<b><u>Discusión</u></b> .....	143
<b><u>Conclusiones</u></b> .....	155
<b><u>Bibliografía</u></b> .....	159
<b><u>Publicación</u></b> .....	179





**ABREVIATURAS**



## Abreviaturas

5-FU:	5-fluorouracilo
7-AAD:	7-aminoactinomicina D
aa:	aminoácidos
AAV:	virus adeno-asociado
ADA:	adenosina desaminasa
ADN:	ácido desoxirribonucleico
AG:	acetato de glatirámero
APC:	célula presentadora de antígeno
APhC:	alofococianina
APL:	ligandos peptídicos alterados
APP:	proteína precursora amiloide
ARN:	ácido ribonucleico
att:	sitio de integración
BHE:	barrera hematoencefálica
BHK/MKL:	línea celular de riñón embrionario de hámster transfectada establemente con ligando de <i>Kit</i> murino
BLV:	virus de la leucemia bovina
BSA:	albúmina sérica bovina
CA:	proteínas de la cápside
CGD:	enfermedad granulomatosa crónica
Cox2	ciclooxigenasa-2
CLIP:	péptido asociado a la cadena invariante de las moléculas de histocompatibilidad de clase II
CMH:	célula madre hematopoyética
CMN:	célula mononucleada
CNPasa:	2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa
DC:	célula dendrítica
DMEM:	medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
DMSO:	dimetil sulfóxido
EAE:	encefalomielitis autoinmune experimental
EGFP:	proteína verde fluorescente mejorada

## **Abreviaturas**

EICH:	enfermedad del injerto contra el huésped
EM:	esclerosis múltiple
EMCD:	esclerosis múltiple clínicamente definida
EMPP:	esclerosis múltiple primariamente progresiva
EMRR:	esclerosis múltiple remitente-recurrente
EMSP:	esclerosis múltiple secundariamente progresiva
FCS:	suero bovino fetal
FS:	<i>forward scatter</i>
GALV:	virus de la leucemia del gibón
GM-CSF:	factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
HBSS:	solución salina tamponada de Hank
HGF:	factor de crecimiento de hepatocitos
HIV:	virus de la inmunodeficiencia humana
HLA:	antígenos leucocitarios humanos
HTLV:	virus de la leucemia T humana
iDC:	célula dendrítica inmadura
i.p.:	intraperitoneal
i.v.:	intravenosa
ICT:	irradiación corporal total
IDO:	indolamina-2,3-dioxigenasa
IFN:	interferón
Ig:	inmunoglobulina
Ii:	cadena invariante
IL:	interleucina
IMDM:	medio de cultivo Dulbecco modificado de Iscove
IMC:	célula mielóide inmadura
IN:	integrasa
IRES:	sitio interno de entrada del ribosoma
iTreg:	célula T reguladora inducida
Lin <sup>-</sup> :	ausencia de expresión de marcadores de linaje
LSK:	población hematopoyética que tiene el fenotipo Lin <sup>-</sup> Sca1 <sup>+</sup> c-kit <sup>+</sup>

## Abreviaturas

LTR:	secuencias repetitivas largas de los extremos
M $\phi$ :	macrófago
MA:	proteínas de la matriz
MAG:	proteína asociada a la mielina
MBP:	proteína básica de la mielina
MDSC:	célula mielóide supresora
MDSV:	virus del sarcoma dérmico de Walleye
MHC:	complejo mayor de histocompatibilidad
MHC-I:	complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I
MHC-II:	complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II
MMTV:	virus del tumor mamario murino
MO:	médula ósea
MOBP:	proteína mielínica básica asociada a los oligodendrocitos
MOG:	glicoproteína mielínica de los oligodendrocitos
MOI:	multiplicidad de infección
MoMLV:	virus de la leucemia murina de Moloney
MSC:	células madre mesenquimales
mSCF:	factor de crecimiento murino de células madre
NC:	proteínas de la nucleocápside
NK:	células asesinas naturales
NO:	óxido nítrico
nTreg:	célula T reguladora natural
OSP:	glicoproteína específica de los oligodendrocitos
p.i.:	post inmunización
PBA-azida:	PBS con albúmina sérica bovina y acida sódica
PBS:	solución salina tamponada con fosfato
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
PE:	ficoeritrina
PGE2	prostaglandina E2
PHA:	fitohemaglutinina
PIs:	partículas infecciosas

## **Abreviaturas**

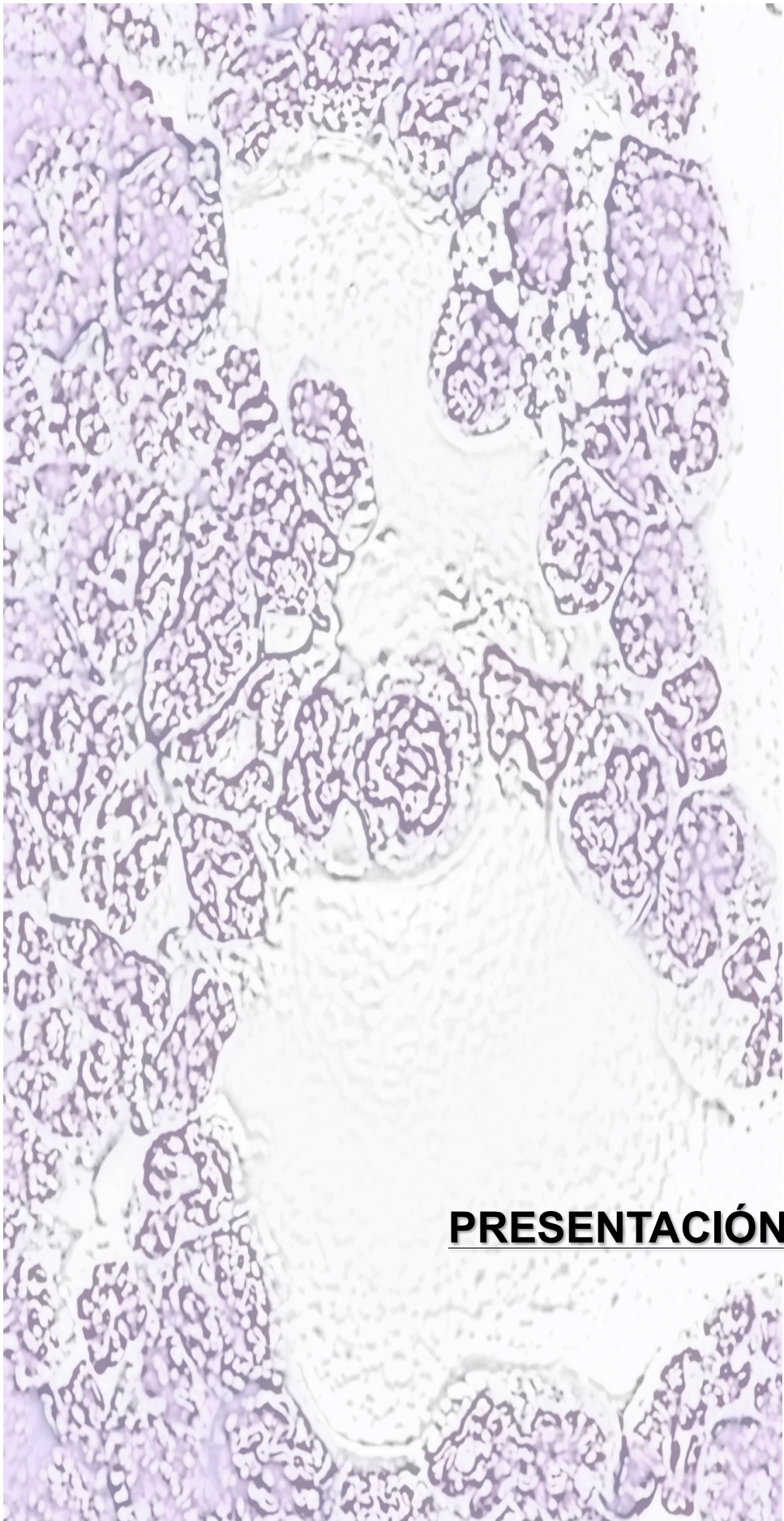
PIC:	complejo de preintegración
PLP:	proteína proteolipídica
PML:	leucoencefalopatía multifocal progresiva
ppt:	región de polipurinas
PR:	proteasa
ROS:	especies reactivas de oxígeno
RPMI:	medio de cultivo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RSV:	virus del sarcoma de Rous
RT:	transcriptasa reversa
s.c.:	subcutánea
Sca:	antígeno de células madre
SCID:	inmunodeficiencia severa combinada
SEM:	error estándar de la media
SNC:	sistema nervioso central
SNA:	síndrome neurológico aislado
SP:	sangre periférica
SS:	<i>side scatter</i>
STAT:	transductor de señal y activador de la transcripción
SU:	glicoproteína de superficie
TAP:	transportador asociado al procesamiento de antígenos
TAPH:	trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos
tARN:	ácido ribonucleico de transferencia
TCR:	receptor de la célula T
TCV:	vacuna de células T
TGF:	factor de crecimiento transformante
Th:	linfocito T colaborador
TM:	glicoproteína transmembranal
TNF:	factor de necrosis tumoral
tolDC:	células dendríticas tolerogénicas
Tp:	toxina pertussis
TPH:	trasplante de progenitores hematopoyéticos

## Abreviaturas

Tr1:	célula T reguladora de tipo 1
Treg:	célula T reguladora
VCAM	molécula de adhesión vascular
VLA:	Virus de la leucemia aviar
VSV-G:	proteína G del virus de la estomatitis vesicular
WAS	síndrome de Wiskott-Adrich
WEHI-3B:	línea celular mielomonocítica murina generada en el <i>Walter and Elizabeth Hall Institute</i>
WT:	<i>wild type</i>

Nota: en la mayoría de abreviaturas se ha mantenido la nomenclatura en inglés por ser la de uso más habitual.





## **PRESENTACIÓN**



El trabajo que se presenta en esta tesis se ha realizado en el laboratorio de Terapia Celular y Génica, del Banc de Sang i Teixits (BST) y del Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR). El laboratorio está dirigido por el Dr. Jordi Barquinero y el presente trabajo es fruto de una colaboración entre su grupo y el de la Dra. Carmen Espejo del Grup de Neuroimmunologia Clínica del VHIR, Centre d'Esclerosis Multiple de Catalunya (Cemcat), Servei de Neurologia-Neuroimmunologia de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, por lo que tanto el Dr. Jordi Barquinero como la Dra. Carmen Espejo son co-directores de esta tesis.

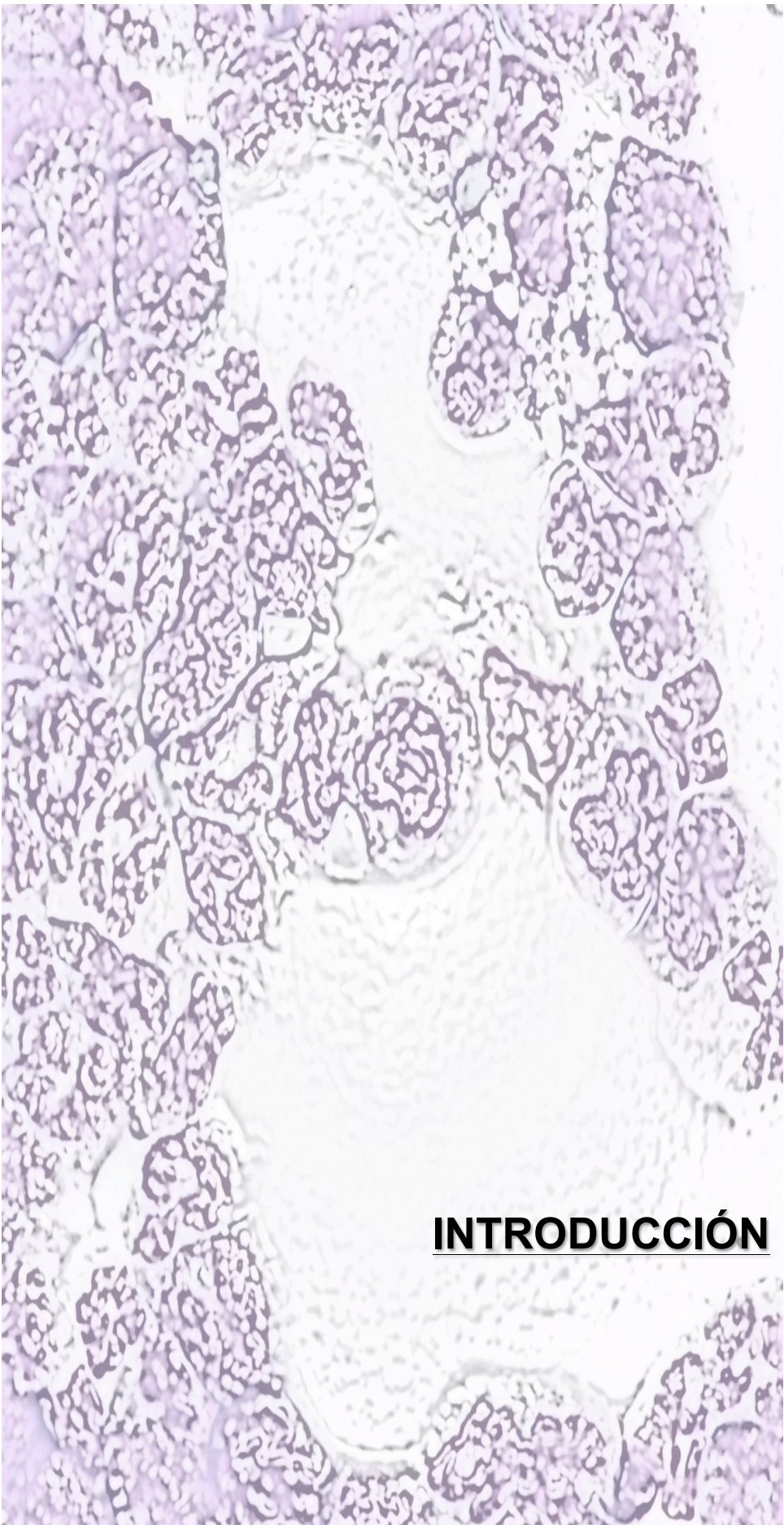
El grupo ha desarrollado una dilatada labor de investigación en el área de la terapia génica y del trasplante hematopoyético a lo largo de su trayectoria. Una de las líneas de investigación ha consistido en estudiar la inducción de tolerancia inmunológica mediante la expresión de autoantígenos en células hematopoyéticas, para lo cual se ha utilizado principalmente un modelo murino de esclerosis múltiple, la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE).

De esta línea de investigación resultó una tesis doctoral y dos publicaciones (Eixarch, et al. 2009, Eixarch, et al. 2009) previas al presente trabajo, donde se demostró que la sobreexpresión de un autoantígeno en las células hematopoyéticas inducía tolerancia inmunológica en el modelo no remitente de EAE, tanto de forma preventiva como terapéutica. Además, la ausencia de quimerismo molecular a largo plazo, la rápida recuperación de los animales en el brazo terapéutico y el hecho que la terapia también funcionara en un contexto no mieloablativo, sugerían que probablemente el efecto no estaba producido por los progenitores con capacidad de repoblación sino por otra población celular que estaría expresando el autoantígeno.

Así, el trabajo que se presenta en esta tesis parte de una observación previa, que es el efecto tolerogénico y terapéutico de la infusión de células de médula ósea que expresaban un autoantígeno en ratones con EAE y tiene como objetivo el estudio y caracterización de las poblaciones celulares que se generarían en los protocolos de transducción de células de médula ósea murina y que serían candidatas a mediar el

## **Presentación**

efecto terapéutico en este modelo de enfermedad, así como los posibles mecanismos de acción que podrían estar implicados en dicho efecto.



## INTRODUCCIÓN



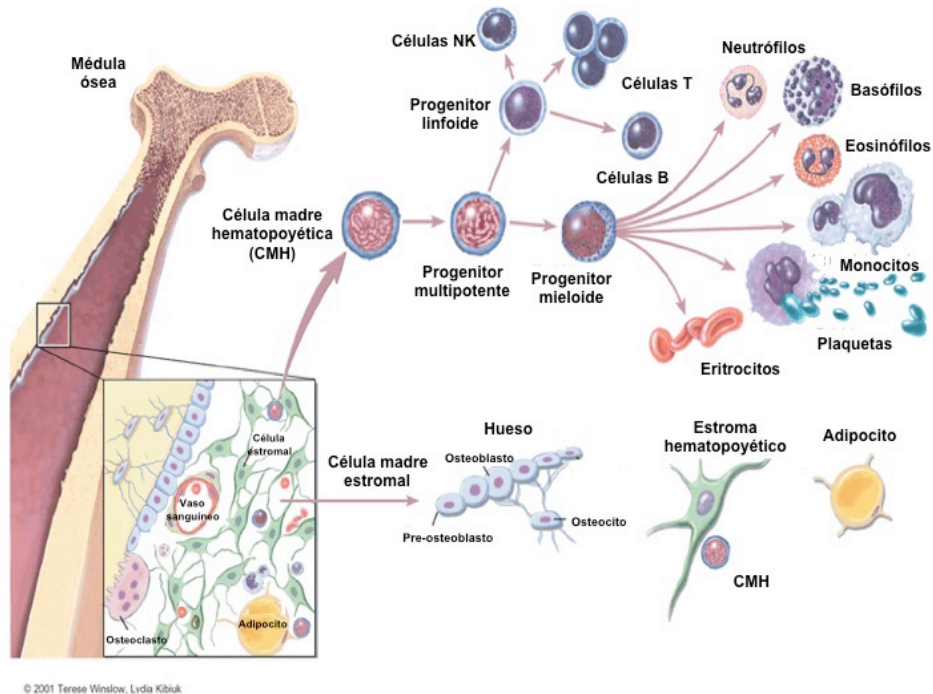
### **1. EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO**

El sistema hematopoyético es un tejido heterogéneo y jerárquico constituido por diferentes tipos celulares cuya homeostasis está finamente regulada. Su función principal es la de generar y renovar constantemente todos los tipos celulares de la sangre y del sistema inmunitario, este proceso se denomina hematopoyesis.

La médula ósea (MO) es el principal órgano hematopoyético del individuo adulto, en ella encontramos células hematopoyéticas, que incluyen las células madre hematopoyéticas (CMHs), progenitores en distintos estados de diferenciación, células maduras y células que contribuyen al microambiente hematopoyético, como las células estromales, así como distintos componentes de la matriz extracelular (Figura 1).

La CMH es un tipo de célula madre adulta con capacidad de autorenovarse y diferenciarse para generar todos los elementos celulares que forman la sangre y el sistema inmunitario. Esta capacidad de autorenovación y diferenciación está controlada por el nicho hematopoyético, que está formado por células mesenquimales, osteocitos, macrófagos (Mφs), adipocitos y células endoteliales, entre otros, que configuran los tres componentes del nicho: soporte celular, matriz extracelular y factores solubles. Todos estos elementos interactúan y dan lugar a una serie de señales que hacen que las CMHs permanezcan quiescentes o entren en división, sin que puedan descartarse factores estocásticos o intrínsecos a la propia CMH (Arai et al. 2005, Chotinantakul and Leeansaksiri 2012).

## Introducción



**Figura 1 - Estructura del sistema hematopoyético.** La MO aloja el sistema hematopoyético adulto, que a partir del nacimiento da lugar a todas las células de los diferentes linajes hematopoyéticos (linfóide y mielóide). Además de ser el soporte físico para las CMHs, el microambiente hematopoyético regula el mantenimiento de la hematopoyesis mediante contactos célula-célula o bien secretando factores que regulan el crecimiento y la diferenciación. Figura adaptada de Terese Winslow y Lydia Kibiuk, 2001©.

Las CMHs son la población menos representada en la MO, en el ratón se encuentran con una frecuencia aproximada de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  células mononucleadas (CMN) y aproximadamente 10 veces menos en los humanos. Sólo una pequeña fracción de las CMHs, alrededor del 1%, están en ciclo celular en un momento dado para generar las  $10^{11}$  células hematopoyéticas que un humano adulto debe producir cada día y, a su vez, mantener estable el compartimento de las CMHs. El resto se mantiene en un estado de quiescencia ( $G_0$ ) (Congdon and Reya 2008).

Aun siendo una de las células madre más estudiadas, todavía no se conoce ningún marcador específico para las CMHs, aunque se han caracterizado subpoblaciones fenotípicamente definidas que tienen una mayor capacidad de repoblación a corto y a

largo plazo. En la MO de ratón las CMHs se encuentran con mayor frecuencia (enriquecidas aproximadamente 1000 veces) en una población caracterizada por la ausencia de marcadores de linaje (Lin<sup>-</sup>) y por la expresión de los marcadores Sca-1 y c-kit, también conocida como LSK (Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> c-kit<sup>+</sup>). El fenotipo más inmaduro descrito dentro de la población LSK es CD34<sup>-</sup> Flk2<sup>-</sup> Slamf1<sup>+</sup>, que está altamente enriquecida en capacidad de repoblación a largo plazo (más de cuatro meses) en ratones irradiados letalmente (Kiel et al. 2005, Yilmaz et al. 2006, Chotinantakul and Leeanansaksiri 2012).

En sangre de cordón umbilical humana se ha descrito que una de cada 10 células de la población Lin<sup>-</sup> CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> CD90<sup>+</sup> tendría capacidad de autorenovación y multipotencialidad, habilidades propias de las CMHs (Majeti et al. 2007, Seita and Weissman 2010).

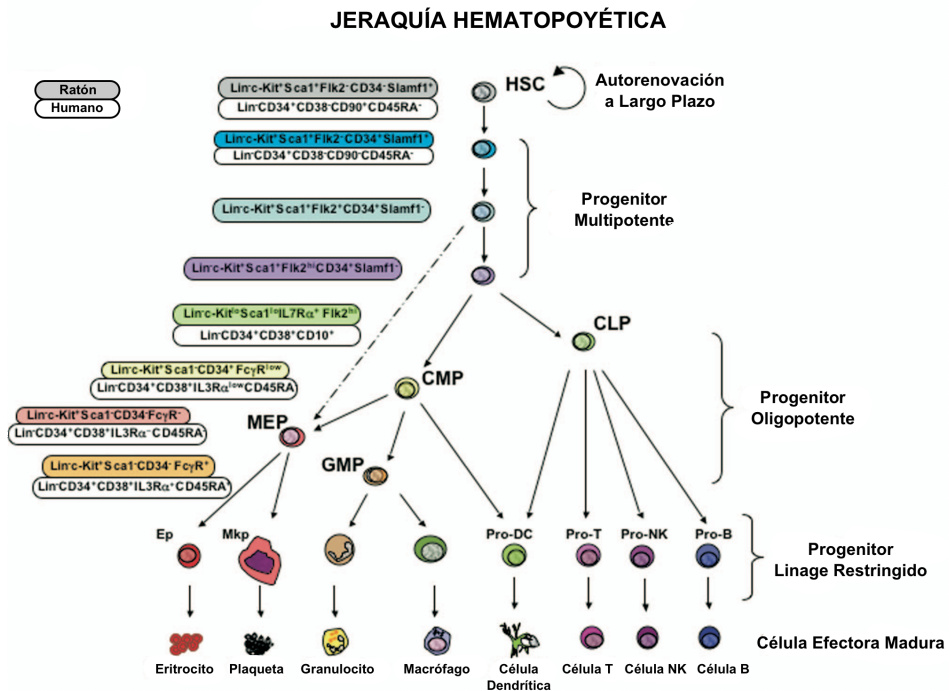
Siguiendo en la jerarquía del sistema hematopoyético encontramos los progenitores comprometidos, que se caracterizan por la pérdida de la capacidad de autorenovación manteniendo cierta capacidad de diferenciación. Esta pérdida de multipotencialidad hace que su diferenciación esté más restringida a un menor número de linajes hematopoyéticos. Dependiendo del linaje al que estén comprometidos podemos diferenciar dos tipos de progenitores, linfoides o mieloides. Los primeros dan lugar a linfocitos T, B o células *asesinas naturales* (NK), estas últimas también pueden ser derivadas de progenitores mieloides, y los segundos generan hematíes, plaquetas, granulocitos y monocitos (Figura 2).

En la MO, además de las CMHs y los progenitores comprometidos en distintos estadios de diferenciación, también encontramos células hematopoyéticas maduras o en proceso de diferenciación que han perdido la capacidad de autorenovación y que generalmente proliferan poco o nada, dependiendo del tipo celular, con excepción de los linfocitos, los cuales sí que tienen un alto potencial proliferativo aun siendo células maduras. (Figura 2).

# Introducción

## 1.1. El trasplante hematopoyético

El trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) tiene como objetivo restablecer un nuevo sistema hematopoyético tras una aplasia medular inducida por dosis altas de quimioterapia y/o radioterapia, por lo que se utiliza como tratamiento para ciertas neoplasias hematológicas, enfermedades hereditarias como inmunodeficiencias severas o para algunas enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple (EM) o la artritis reumatoide, aunque estas últimas aplicaciones están aún en fase experimental.



**Figura 2 – Jerarquía hematopoyética.** A medida que las células progenitoras hematopoyéticas se van diferenciando a los diferentes linajes, pierden su pluripotencialidad y su capacidad de autorenovación. Figura adaptada de Weisman et al. 2012.

Existen cuatro clases de TPH que se diferencian por la compatibilidad inmunológica entre el receptor y el donante:

- **Xenotrasplante:** la fuente celular proviene de un donante de una especie diferente. Este tipo de trasplante no se realiza de forma rutinaria en la clínica humana por los grandes problemas infecciosos e inmunológicos que comporta. Aunque actualmente está en fase experimental, en un futuro el

xenotrasplante (p. e. a partir de tejidos de cerdo) podría constituir una terapia alternativa para sustituir el trasplante de órganos de procedencia humana, ya que la escasez de donantes constituye una de las mayores limitaciones.

- **Trasplante alogénico:** el donante y el receptor son de la misma especie pero presentan diferencias genéticas que se traducen en problemas de histocompatibilidad, de rechazo (tanto del huésped contra el injerto, como del injerto contra el huésped -EICH-). Este tipo de trasplante se utiliza rutinariamente en pacientes con cánceres hematológicos por su efecto anti-leucémico.
- **Trasplante singénico:** es uno de los tipos de trasplantes más seguros para el trasplante hematológico, pero poco utilizado en la práctica. El donante y el receptor son gemelos idénticos, lo que anula la posibilidad de rechazos debido a que no existen diferencias genéticas entre ellos, si bien la ausencia de aloreactividad reduce su eficacia anti-leucémica. En el ratón se usa esta modalidad de trasplante entre hermanos con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) idénticas como equivalente al trasplante autólogo, por razones prácticas.
- **Trasplante autólogo:** la fuente celular se obtiene del propio paciente, esto implica menos complicaciones relacionadas con el trasplante. Se utiliza casi exclusivamente en pacientes con hemopatías malignas (como rescate de su sistema hematopoyético destruido por las dosis altas de quimioterapia y/o radioterapia). Este tipo de trasplante evita el rechazo y la EICH pero al carecer de aloreactividad también se asocia a un mayor riesgo de recaída de la enfermedad.

Antes del trasplante, el paciente debe recibir un tratamiento preparativo que se conoce como acondicionamiento. Los objetivos del acondicionamiento son:

- Ablación o eliminación del clon o clones tumorales en hemopatías malignas.
- Inmunoablación o inmunosupresión para evitar el rechazo del injerto.

## **Introducción**

- Eliminación de las células hematopoyéticas endógenas (mieloablación) para "crear espacio" en la MO y facilitar el injerto.

Como pauta de acondicionamiento clásicamente se han utilizado dosis altas de irradiación corporal total (ICT) acompañadas o no de fármacos quimioterápicos. Actualmente se sustituyen, siempre que es posible, las dosis altas de ICT por dosis altas de agentes mielotóxicos como el melfalán o el busulfán combinados (en el caso de los trasplantes alogénicos) con inmunosupresores como la ciclofosfamida. En función de la intensidad del acondicionamiento utilizada tenemos desde los trasplantes completamente mieloablativos, en los que se destruyen el máximo número de células propias del receptor para que sean sustituidas por las del donante, de forma que se reduce al máximo el riesgo de rechazo, hasta los mínimamente mieloablativos o no mieloablativos, en los que se realiza un acondicionamiento de intensidad reducida, de forma que se produce una eliminación mínima o parcial de la células hematopoyéticas del receptor, reduciendo los riesgos de infección, y en el caso que haya rechazo del injerto no compromete la vida del paciente (Champlin et al. 2000).

Dependiendo del tipo e intensidad del acondicionamiento que se use obtendremos diferentes tipos de quimerismos hematopoyético. El quimerismo hematopoyético es el porcentaje de células del receptor y del donante que encontramos en la sangre del receptor una vez realizado el TPH (McCann et al. 2005). Dependiendo de este porcentaje podemos clasificar el quimerismo en tres tipos: completo, mixto y microquimerismo (tabla 1).

**Tabla 1: Tipos de quimerismo hematopoyético**

Grado de Quimerismo	Definición
Quimerismo Completo	100% células del Donante
Quimerismo Mixto	5-99% células del Donante
Microquimerismo	<1% células del Donante

*Tabla adaptada de (Khan et al. 2004).*

Dado que la toxicidad del acondicionamiento es uno de los factores que más limitan el uso de los TPH, estos regímenes de acondicionamiento han ido evolucionando a pautas mieloablativas e inmunosupresoras cada vez mejor toleradas por los pacientes y, de hecho, en los últimos años ha aparecido una nueva modalidad de trasplante alogénico conocida como minitrasplante o “minialo”, en la que se realiza un acondicionamiento de intensidad reducida, cuyo objetivo es producir una mieloablación parcial y la creación de un estado de quimerismo mixto tras el trasplante. En una segunda fase, la simple infusión de linfocitos del donante puede convertir este quimerismo mixto en un quimerismo completo. Estos trasplantes se asocian a una menor toxicidad, por lo que pueden ser aplicados a pacientes de edad relativamente avanzada que probablemente no resistirían un trasplante mieloablativo convencional.

En los trasplantes autólogos no hay en principio ninguna necesidad de inmunosupresión con lo que los objetivos antes citados se reducen a dos. En el caso de la terapia génica hematopoyética el acondicionamiento tendría como único objetivo la creación de espacio en la MO, aunque este es un concepto controvertido. En realidad no está demasiado claro por qué es necesario deplecionar la MO, podría ser por una cuestión de espacio: el nicho hematopoyético está ocupado por CMHs endógenas y las células trasplantadas no encontrarían nichos libres para anidar. O una cuestión de competencia: en realidad en la MO habría espacio disponible, pero al estar las células endógenas en mucho mayor número, las CMHs trasplantadas lo tendrían muy difícil para competir con ellas por los nichos hematopoyéticos (Stewart et al. 1993, Bachar-Lustig et al. 1998, Rachamim et al. 1998). El acondicionamiento reduce drásticamente el número de células endógenas, con lo que la competencia para las CMHs trasplantadas es menor y las posibilidades de anidar en la MO del huésped también son mayores.

## **2. TERAPIA GÉNICA HEMATOPOYÉTICA**

La terapia génica se define como el conjunto de estrategias o técnicas que nos permiten modificar genéticamente células o tejidos diana mediante la introducción de

## **Introducción**

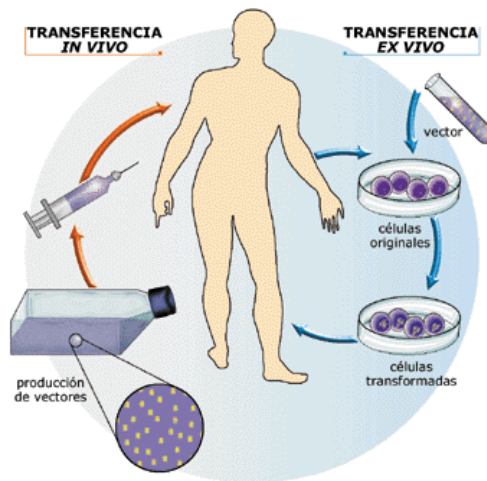
material genético, con el objetivo de conseguir ganancias o pérdidas de función de una proteína, con una finalidad terapéutica. El concepto de terapia génica surgió en los años 70 cuando se empezó a estudiar el efecto de la introducción de ADN en líneas celulares y los mecanismos de infección y retrotranscripción de los retrovirus y otros virus ARN (Osterman et al. 1970, Friedmann 1992).

En los años 90 del pasado siglo la terapia génica sufrió un crecimiento espectacular tanto a nivel de investigación básica como en número de ensayos clínicos. Durante la década de los 80 se desarrollaron las primeras líneas celulares empaquetadoras de vectores virales recombinantes que permitieron generar preparados con títulos altos de éstos y se realizaron los primeros estudios de transferencia génica en animales (Williams et al. 1984, Kantoff et al. 1986, Kwok et al. 1986, Yu et al. 1986, Kantoff et al. 1987). A principios de los 90 se iniciaron los primeros ensayos clínicos. Aun siendo una disciplina relativamente joven, esta no ha parado de evolucionar para mejorar las técnicas y solucionar los problemas que han ido surgiendo.

La terapia génica puede realizarse *in vivo* o *ex vivo* (Figura 3). La terapia génica *in vivo* consiste en administrar el vector portador del transgén directamente en el tejido diana o a la circulación sanguínea. Uno de los riesgos más graves de la terapia génica *in vivo*, dado que no se puede controlar que el vector no alcance otros tejidos no deseados, si se usan vectores integrativos, es la posibilidad de transducir la línea germinal y modificar el patrimonio genético de la especie de una forma artificial. La terapia génica *ex vivo*, por el contrario, se lleva a cabo sobre células extraídas del individuo, que una vez transducidas son infundidas de nuevo al paciente. Los primeros ensayos clínicos que se realizaron fueron de terapia génica *ex vivo*, precisamente utilizando células hematopoyéticas (Blaese et al. 1993). Pero no fue hasta inicios del siglo XXI cuando se publicaron los resultados del primer ensayo clínico con éxito (Cavazzana-Calvo et al. 2000).

### 2.1 Herramientas de transferencia génica

La terapia génica se basa en una gran variedad de herramientas y estrategias para transferir material genético a células o tejidos diana. En la elección del método más adecuado de transferencia génica se han de tener en cuenta varios aspectos, como el tipo de célula o el tejido diana, la eficiencia requerida y la estabilidad deseada de la expresión del transgén.



**Figura 3 - Estrategias de terapia génica. Ver texto.**  
*Imagen tomada de adngenica.blogspot.com.*

Existe una gran variedad de métodos de transferencia génica que se pueden clasificar en función de si se emplean métodos físico-químicos (transfección) o vectores virales (transducción) (Tabla 2). En general los métodos físico-químicos se utilizan cuando no se requiere una expresión duradera del transgén en las células diana. Sin embargo, cuando se requiere una expresión estable a largo plazo y/o una eficiencia elevada, en general deben utilizarse vectores virales, que son más eficientes debido a que aprovechan la capacidad natural de los virus de introducir material genético en las células que infectan.

## Introducción

**Tabla 2: Métodos de transferencia génica**

Métodos Físico-Químicos		Vectores Virales	
Físicos	Electroporación Microinyección <i>Gene gun</i> o cañón de genes	Integrativos	γ-retrovirus Lentivirus Espumavirus ( <i>Foamy virus</i> )
Químicos	Fosfato Cálcico Liposomas Endocitosis mediada por receptor	No Integrativos	Adenovirus Virus Adenoasociados Herpesvirus Poxvirus Virus Vaccinia

Los vectores virales derivan de virus que han sido modificados eliminando su capacidad replicativa, es decir, que pueden introducir su material genético dentro de la célula pero, por sí solos, no pueden generar nuevos virus, al haber sido despojados de todos o de la mayoría de sus genes. Los vectores virales se pueden clasificar en dos grandes grupos: integrativos o no integrativos (Tabla 2). Los adenovirus son los vectores no integrativos más usados, sobre todo en ensayos clínicos en cáncer (Lang et al. 2003, Teh et al. 2004, Wolf et al. 2004, Young et al. 2006, Aad et al. 2015, Gupta et al. 2015) dado que en estos casos, en general, no se requiere una expresión estable del transgén sino un efecto transitorio (por ejemplo la expresión de genes suicidas o la inducción de una respuesta inmune anti-tumoral). Otro tipo de vectores no integrativos que ha demostrado tener éxito en ensayos de terapia génica son los adeno-asociados (AAVs) dirigidos a hígado y retina como tejidos diana (Bainbridge et al. 2008, Nathwani et al. 2011). Pero cuando se trata de enfermedades genéticas hereditarias se persigue justo lo contrario, una expresión del gen terapéutico a largo plazo, para lo que lo más adecuado es el uso de vectores integrativos, y además utilizando si es posible células madre como diana.

**Tabla 3: Familia *Retroviridae***

Género	Especies representativas	Genoma
$\alpha$ -retrovirus	Virus del sarcomas de Rous (RSV) Virus de la leucemia aviar (VLA)	Simple
$\beta$ -retrovirus	Virus del tumor mamario murino (MMTV)	Simple
$\gamma$ -retrovirus	Virus de la leucemia de Moloney murina (MoMLV)	Simple
$\delta$ -retrovirus	Virus de la leucemia bovina (BLV) Virus de la leucemia T humana (HTLVII/III)	Complejo
$\epsilon$ -retrovirus	Virus del sarcoma dérmico de Walleye (MDSV)	Simple
Lentivirus	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (HIV-I)	Complejo
Espumavirus	Espumavirus humano	Complejo

De éstos, los que más se usan son los derivados de los virus de la familia *Retroviridae*, que incluye siete géneros (Tabla 3), dos de los cuales son usados ampliamente en terapia génica: los lentivirus y los  $\gamma$ -retrovirus, aunque también existen vectores basados en los espumavirus. Aunque los tres géneros citados son retrovirus, este término se usa comúnmente para referirse a los  $\gamma$ -retrovirus (anteriormente conocidos como oncoretrovirus), por lo que en este trabajo nos referiremos a los vectores basados en los  $\gamma$ -retrovirus como vectores retrovirales para diferenciarlos del resto de vectores.

Los vectores retrovirales basados en el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV) fueron los primeros en ser utilizados como vectores en ensayos clínicos de enfermedades hereditarias, si bien hoy día están siendo desplazados en muchas aplicaciones por los vectores lentivirales.

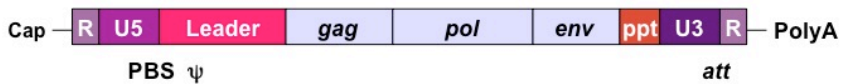
## Introducción

### 2.2. Vectores retrovirales

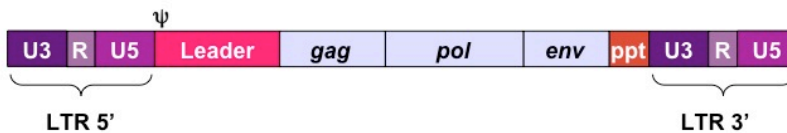
#### a. Características generales de los retrovirus

Los retrovirus son virus ARN de cadena sencilla con envuelta lipídica, con un diámetro aproximado de 80-120 nm. Se caracterizan por su capacidad de convertir las moléculas de ARN en ADN de doble cadena. Esta molécula de ADN viral se integra en el genoma de la célula huésped permitiendo así la replicación del virus. Los retrovirus se pueden clasificar en simples y complejos atendiendo a la complejidad de su genoma (Tabla 2). El genoma de los retrovirus simples contiene únicamente la información genética elemental (Figura 4) y común a todos los retrovirus, mientras que el de los complejos codifica además para proteínas reguladoras adicionales.

a)



b)



**Figura 4 - Esquema del genoma retroviral simple.** a) Ilustración del ARN genómico retroviral con sus componentes básicos. b) Esquema del ADN viral una vez retrotranscrito en la célula huésped (provirus).  $\psi$ : señal de empaquetamiento; att: sitio de integración (attachment); LTR: secuencias repetitivas largas de los extremos; PBS: primer binding site; PolyA: secuencia de poliadenilación.

El genoma de los retrovirus está compuesto por dos cadenas sencillas de ARN que forman un dímero mediante puentes de hidrógeno y tienen un tamaño variable de 8-12 Kb. Concretamente, el genoma del MoMLV tiene un tamaño aproximado de 9,7 Kb. La región codificante común a todos los retrovirus contiene tres genes, ordenados de 5' a 3':

- **gag** codifica para proteínas estructurales internas no glicosiladas: proteínas de la cápside (CA), proteínas de la matriz (MA) y proteínas de la nucleocápside (NC).
- **pol** codifica para las enzimas necesarias para la replicación viral: transcriptasa reversa (RT), integrasa (IN) y proteasa (PR).
- **env** codifica para las glicoproteínas de la envuelta, glicoproteína transmembranal (TM) y glicoproteína de superficie (SU), que determina el tropismo del virus, es decir, el tipo celular y la especie que el virus puede infectar.

Asimismo el genoma retroviral contiene una serie de regiones no codificantes comunes a todos los retrovirus (de 5' a 3'):

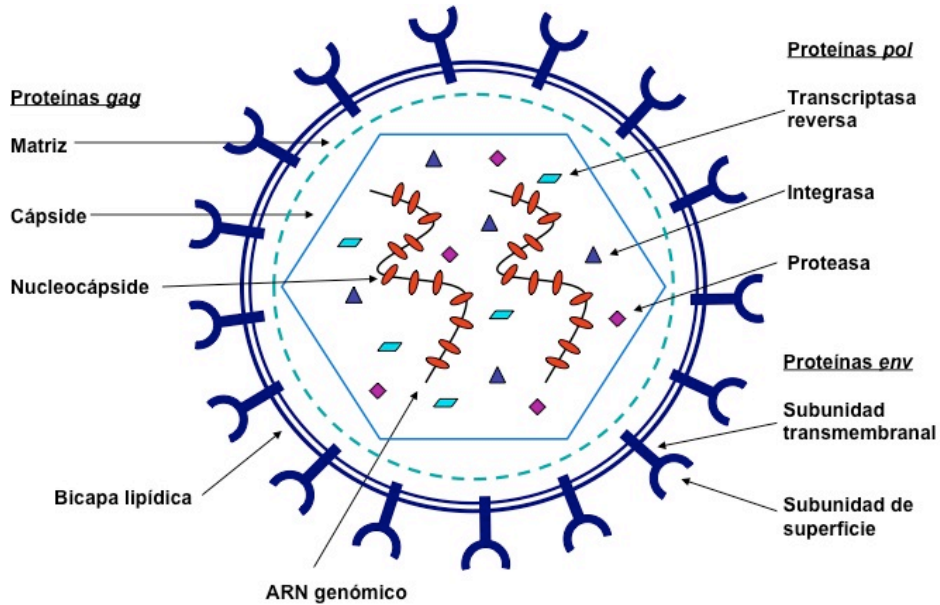
- **Región cap:** ribonucleótido metilado unido al primer nucleótido del ARN viral. Está implicada en la traducción.
- **Región R:** secuencia corta (15-250 nucleótidos) que contiene una cola de poliadenilación y que se encuentra repetida en ambos extremos del genoma retroviral.
- **U5:** región formada por 70-250 bases situada entre la región R y el sitio de unión del iniciador (*Primer Binding Site*, PBS). Es la primera región del genoma que se retrotranscribe formando el extremo 3' del genoma del provirus.
- **Sitio de unión del iniciador (PBS):** secuencia de 18 nucleótidos complementaria al extremo 3' del tARN iniciador específico usado por el virus para iniciar la retrotranscripción.
- **Señal de empaquetamiento o encapsidación ( $\Psi$ ):** secuencia que forma una estructura secundaria imprescindible para que las moléculas de ARN genómico de nueva síntesis sean reconocidas por las cápsides de nueva formación y las empaqueten o encapsiden para formar nuevos viriones.
- **Región leader:** región de 90 a 500 nucleótidos donde se encuentran las secuencias de reconocimiento y de unión a factores de transcripción esenciales para la expresión del genoma viral.

## Introducción

- **Región de polipurinas** (*polypurine tract, ppt*): región corta (7-18 bases) rica en purinas (A/G) responsable del inicio de la síntesis de la cadena positiva durante la retrotranscripción. Es el primer elemento que se encuentra a 3' de la región codificante del genoma retroviral.
- **U3**: región formada por 200-1200 bases, contiene elementos promotores y potenciadores (*enhancer*), así como el sitio *att* (*attachment*), imprescindible para la integración del provirus en el genoma de la célula huésped.

El ARN del virus está unido a nucleoproteínas formando así la nucleocápside. Este complejo proteínas-ARN se localiza dentro de la cápside, junto a las proteínas codificadas por el gen *pol* (RT, PR e IN) necesarias para el ciclo vital del virus. La cápside está cubierta por las proteínas que componen la matriz. La envuelta retroviral, que recubre la matriz, está formada por la membrana de la célula huésped (es por tanto una bicapa lipídica) en la que se encuentran insertadas las glicoproteínas de la envuelta, codificadas por el gen *env*, y que le confieren el tropismo al virus. Las glicoproteínas de la envuelta están formadas por dos subunidades, transmembranal y de superficie, que están unidas entre sí por puentes disulfuro (Figura 5).

El ciclo vital de los retrovirus empieza por el reconocimiento y la unión específica de las moléculas de la envuelta a receptores de membrana de la célula que va a infectar, a lo que sigue un proceso de internalización por fusión de las membranas viral y celular. Una vez en el citoplasma de la célula, la cápside viral se desestructura liberando el genoma y las proteínas virales. Es entonces cuando el ARN viral se retrotranscribe a ADN de doble cadena por acción de la RT, dando lugar al provirus (Figura 6), que contendrá las secuencias largas repetitivas de los extremos (LTR), regiones de unos 300-1800 pares de bases formados por las regiones 5'- U3-R-U5 -3', y que se encuentran a ambos extremos del genoma viral.



**Figura 5 – Esquema general de un retrovirus y sus componentes. Ver texto.**

Estos LTRs contienen regiones promotoras y activadoras esenciales para la expresión de los genes virales en la célula huésped, además de secuencias importantes para la integración. El complejo de preintegración (PIC) se forma por la unión de proteínas citoplasmáticas al ADN de doble cadena viral y es transportado al núcleo para que el provirus se pueda integrar en el genoma de la célula huésped.

En el caso de los  $\gamma$ -retrovirus, el complejo PIC es de tamaño relativamente grande y poco nucleofílico, y no es capaz de atravesar la membrana nuclear intacta, requiriendo que la célula esté en fase de mitosis (cuando la membrana nuclear está desestructurada) para poder alcanzar e integrarse en su genoma. Esta es una gran diferencia con los lentivirus, los cuales sí pueden infectar células quiescentes ya que su complejo PIC, de menor tamaño y mayor nucleofilia, puede atravesar los poros de la membrana nuclear intacta, por lo que estos vectores, a diferencia de los  $\gamma$ -retrovirus, pueden transducir células quiescentes. Una vez el provirus se ha integrado en el genoma celular, este se sirve de la maquinaria transcripcional de la célula para

## Introducción

transcribir moléculas de ARN viral, que podrán ser traducidas para dar lugar a las proteínas necesarias para formar nuevos viriones y, por otra parte, podrán ser empaquetadas en éstos, gracias a la secuencia de empaquetamiento o encapsidación ( $\psi$ ), para generar nuevas partículas infecciosas (PIs). Las glicoproteínas de la envuelta de nueva síntesis se expresan en la membrana celular, lugar donde los componentes virales se ensamblan y los ARN que contengan la secuencia  $\psi$  y tengan el tamaño adecuado serán encapsidados. Los viriones de nueva formación son extruídos (proceso denominado *budding*) de la célula, llevándose con ellos una parte de la membrana celular (por eso son virus envueltos), que contienen en su superficie la glicoproteína de la envuelta, y podrán infectar nuevas células, iniciando un nuevo ciclo vital. En la Figura 6 se esquematiza el ciclo vital del retrovirus. El proceso de extrusión no lisa la célula huésped, de manera que toda la progenie de esta llevará integrado el provirus, que se replicará junto al genoma de las células huéspedes.

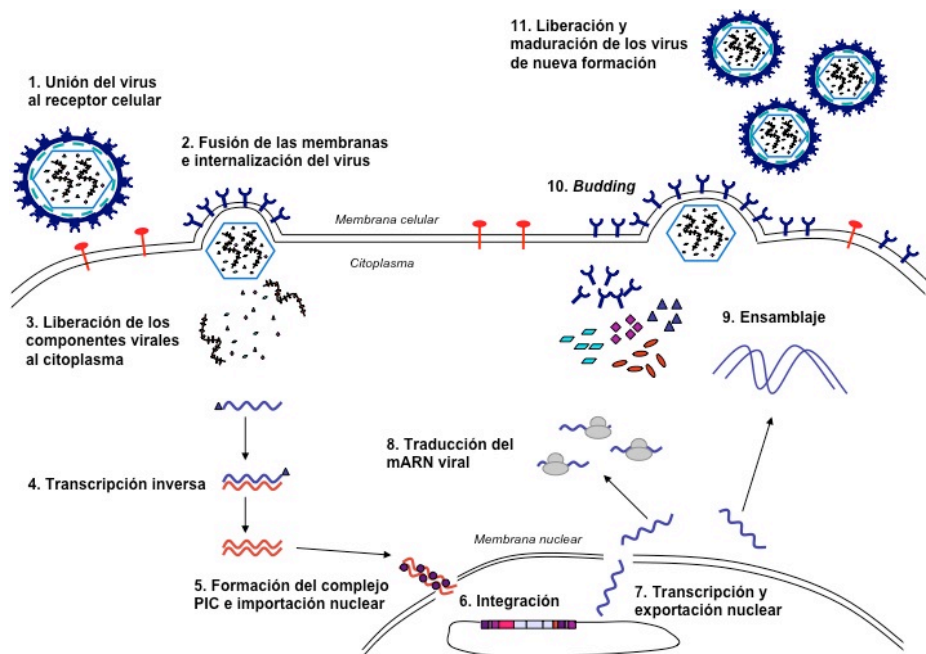


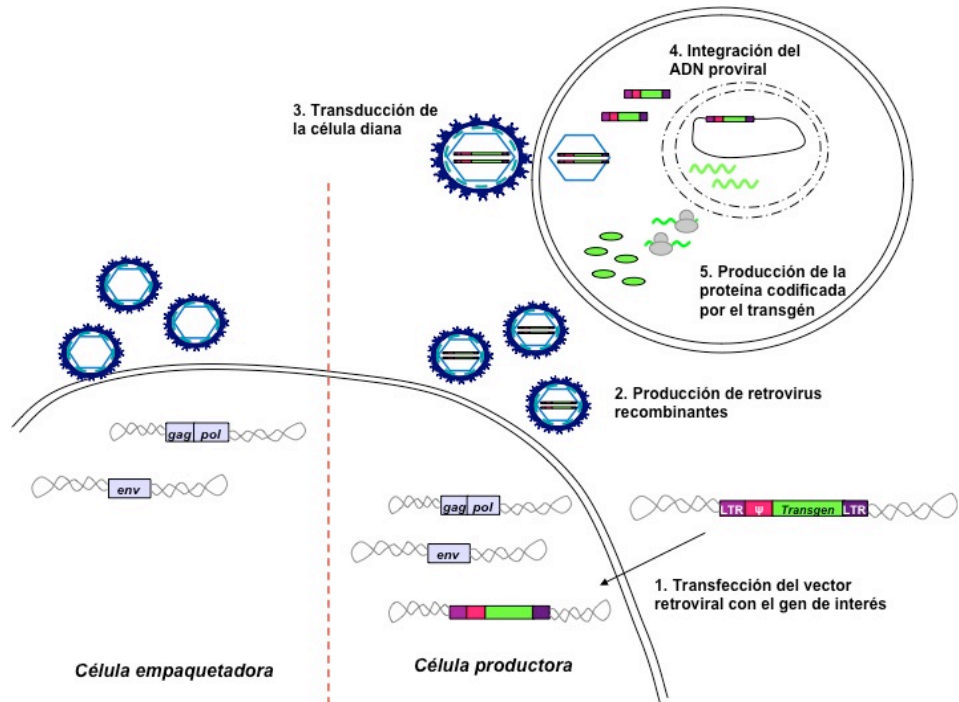
Figura 6 - Esquema del ciclo vital de los retrovirus. Ver texto.

### **b. Vectores retrovirales recombinantes**

Los primeros vectores retrovirales se basaron en el genoma del  $\gamma$ -retrovirus MoMLV. Al genoma del virus salvaje se le sustituyen los genes virales por uno o varios genes de interés. Estos vectores recombinantes conservan algunas regiones no codificantes, incluyendo la señal de empaquetamiento ( $\psi$ ), y a veces también se añade un promotor de interés. De esta manera, los vectores se integran en el genoma de la célula huésped pero son incapaces de generar las proteínas virales necesarias para generar nuevas partículas virales al carecer de los genes víricos necesarios.

La producción de vectores retrovirales recombinantes se realiza en líneas celulares empaquetadoras, que expresan, de forma estable o transitoria, los genes virales necesarios para producir las proteínas virales en trans. En general se separan en dos plásmidos; uno contiene los genes *gag* y *pol* y el segundo el gen *env*. Con estos elementos las células empaquetadoras sólo producen cápsides virales vacías al no reconocer ningún ARN, ya que en estos se ha eliminado la secuencia  $\psi$  y no pueden ser empaquetados (Figura 7). Cuando se introduce el vector retroviral con el gen o genes de interés en las células empaquetadoras, una región de la proteína viral gag reconoce la secuencia  $\psi$  en el transcrito codificado por el vector retroviral y lo empaquetan en los viriones de nueva formación. Estas células se denominan entonces células productoras de vectores (Figura 7). Una vez introducidos mediante vectores retrovíricos convencionales, el transgén o transgenes de interés se expresan a lo largo de la vida de la célula y pasan a su progenie al estar integrados en su genoma, produciendo además la proteína codificada por el transgén.

## Introducción



**Figura 7 - Células empaquetadoras y productoras.** Esquema de las células empaquetadoras (panel izquierdo), de las células productoras (panel derecho) y de la transferencia del transgén de interés a la célula diana.

Un punto importante en la producción del vector retroviral es la elección del pseudotipo, que consiste en elegir la glicoproteína de la envuelta que determinará el tropismo del vector o mejorará la capacidad infectiva del vector hacia un determinado tipo celular, en función de los receptores de membrana que estas posean. Se han utilizado diferentes glicoproteínas (Tabla 4), que en general reconocen de forma específica receptores o moléculas de membrana de la célula diana, excepto la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), que puede fusionarse directamente con la membrana de la célula huésped sin reconocimiento específico de receptor (Yee et al. 1994).

**Tabla 4: Proteínas de la envuelta más usadas para pseudotipar**

	Procedencia	Receptor	Función del receptor	Tropismo
Anfotrópico	Glicoproteína gp70 del virus de la MLV (cepa anfotrópica)	Pit-2	Canal de fosfato	Primates, perro, gato, gallina, roedores
Ecotrópico	Glicoproteína gp70 del virus de la MLV (cepa ecotrópica)	CAT-1	Transportador de aa catiónicos	Rata y ratón
GALV	Glicoproteína gp70 del virus de la leucemia del gibón	Pit-1	Canal de fosfato	Primates, perro y rata
RD114	Proteína de la envuelta del virus endógeno felino	RDR	Transportador de aa neutros	Primates, perro y gato
10A1	Glicoproteína gp70 del clon 10A1 del virus de la MLV	Pit-1 Pit-2	Canales de fosfato	Primates, perro, gato, rata, ratón
VSV-G	Glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular	Fosfolípidos de la membrana	Componentes de la membrana celular	Ubicuo

El MoMLV salvaje puede tener la envuelta ecotrópica (que sólo permite infectar células murinas) o anfotrópica, que permite infectar células de diversas especies, incluida la humana (Palu et al. 2000), por lo que los primeros vectores retrovirales utilizaban estas envueltas o bien la envuelta de la cepa 10A1 del MoMLV que permite infectar células humanas y de ratón gracias a su capacidad de reconocer dos receptores de membrana, Glvr-1 (Pit-1) y Ram-1 (Pit-2) (Miller 1996, Miller and Chen 1996, Palu et al. 2000). Posteriormente se cambió esta glicoproteína por la de la envuelta del virus de la leucemia del Gibón (GALV) (Kavanaugh et al. 1994), (Kiem et al. 1997) que aumentaba la eficiencia de transducción en CMHs humanas (van Hennik et al. 1998, Barquinero et al. 2000). La envuelta GALV es la más utilizada para transducir CMHs

## **Introducción**

humanas con  $\gamma$ -retrovirus, en el caso de las CMHs murinas la envuelta más utilizada es la ecotrópica.

### **2.3. Ensayos clínicos de terapia génica hematopoyética.**

Durante las dos últimas décadas la terapia génica se ha aplicado a diversas enfermedades tanto monogénicas (p.e. hemofilia) como otras enfermedades más complejas como el cáncer, la diabetes mellitus o las enfermedades cardiovasculares. Al derivar todas las células inmunitarias de las CMHs, la terapia génica hematopoyética es una estrategia potencialmente curativa para diversas formas de inmunodeficiencias primarias, entre otras enfermedades. De hecho, por el momento, los ensayos que han mostrado mayor beneficio clínico han sido los aplicados a inmunodeficiencias de causa genética (Alexander et al. 2007, Aiuti and Roncarolo 2009, Boztug et al. 2010)

La primera inmunodeficiencia primaria tratada mediante terapia génica fue la inmunodeficiencia combinada severa por deficiencia de la enzima adenosina desaminasa (ADA-SCID) caracterizada por toxicidad debido a la acumulación de metabolitos de purinas que afecta a la supervivencia y función de las células T, B y NK. Los primeros ensayos clínicos realizados a principios de los años 90 se basaron en la infusión de linfocitos o de CMHs corregidos genéticamente (Blaese et al. 1993, Blaese et al. 1995, Bordignon et al. 1995, Kohn et al. 1995), pero los resultados no fueron los esperados.

En el año 2002 un grupo italiano mejoró el protocolo introduciendo una pauta de acondicionamiento parcialmente mieloablativa (4 mg/kg de busulfán) que facilitaba el injerto de las CMHs corregidas genéticamente (Aiuti et al. 2002), y la retirada de la terapia substitutiva con PEG-ADA, lo que se tradujo en una normalización de la función inmunitaria y una clara mejoría clínica.

En el año 2000, un grupo francés publicó los resultados del primer ensayo clínico que se consideró exitoso, en otra forma de inmunodeficiencia combinada severa (SCID-X1) causada por mutaciones de la cadena gamma común ( $\gamma_c$ ) que forma parte de varios receptores de interleucinas. Hasta el momento se han tratado con relativo éxito casi una treintena de pacientes en Francia y en el Reino Unido (Cavazzana-Calvo et al. 2000, Hacein-Bey-Abina et al. 2002, Gaspar et al. 2004, Fischer et al. 2011)

Otro ensayo de terapia génica hematopoyética usado en una inmunodeficiencia primaria y que tuvo un éxito relativo fue en niños con síndrome de Wiskott-Adrich (WAS). Entre 2006 y 2010 se trataron a diez pacientes a los cuales se les trasplantaron células CD34<sup>+</sup> autólogas transducidas con un vector retroviral que contenía el gen WAS funcional. Nueve de los diez pacientes presentaron valores normales y estables de la proteína WAS en células linfoides, mieloides y plaquetas y normalización del recuento de plaquetas (Boztug et al. 2010). Por contra, siete de los pacientes desarrollaron leucemias agudas (una leucemia mieloide aguda (AML), cuatro leucemias linfoblásticas agudas de células T (ALL-T), dos ALL-T primarias con AML secundarias). Se analizaron los sitios de inserción del vector retroviral y se vio que había una asociación de las leucemias con una expansión clonal de células con el vector integrado en diferentes oncogenes, LMO2 (seis ALL-T), MDS1 (dos AML), MN1 (una AML) y también se detectaron translocaciones cromosómicas (Braun et al. 2014).

### **2.4. Riesgos de la terapia génica**

Uno de los principales riesgos de la terapia génica basada en vectores integrativos es la mutagénesis por inserción, que en algunos casos es oncogénica, ya sea por activación de oncogenes o por inactivación de genes supresores de tumores. Esta posibilidad, en un principio se había considerado extraordinariamente remota después de las observaciones en modelos preclínicos y en los primeros ensayos clínicos que se realizaron entre 1990 y 2000, ya que en ninguno de ellos se había reportado este tipo de complicación, pero la aparición de leucemias de células T en cinco de los 16 pacientes

## **Introducción**

con SCID-X1 tratados con terapia génica confirmaron que la mutagénesis insercional era una posibilidad no tan remota, al menos en este ensayo clínico concreto (Hacein-Bey-Abina et al. 2003). En la mayoría de los casos, las células leucémicas presentaban una inserción activadora del vector retroviral cercana al gen *LMO-2*, que está implicado en el 10% de las leucemias de células T (Chinen and Puck 2004), y que se considera un elemento causal en la aparición de leucemias en estos pacientes. Otro posible factor que podría haber favorecido la leucemogénesis podría ser la propia sobreexpresión del transgén terapéutico (*IL2RG*), componente de varios receptores de citocinas, que podría haber actuado como un oncogén favoreciendo la proliferación de las células que lo sobreexpresaban (Dave et al. 2004, Woods et al. 2006).

*LMO2*, no es el único pro-oncogen descrito como sitios de inserción y relacionado leucemogénesis, otros genes como *MDL-1*, *PRDM16*, *CCND2* o *MN1* también se han descrito como sitios de inserción y directamente relacionados con leucemias en ensayos clínicos de terapia génica (Ott et al. 2006), como serían los siete casos de leucemias descritos en el ensayo clínico de WAS (Braun et al. 2014).

Hay múltiples factores que pueden estar implicados en la oncogénesis insercional, uno es el tropismo integrativo del propio vector, en el caso de los vectores retrovirales debemos tener en cuenta su preferencia por integrarse cerca de las regiones reguladoras de los genes, a diferencia de los vectores lentivirales (como los derivados del HIV), que no tienen esta preferencia o por lo menos de forma tan marcada (De Palma et al. 2005). Otro elemento crítico es el promotor que se usa para expresar el transgén, la utilización de vectores SIN (*self inactivating vectors*), en los que se ha eliminado la actividad promotora y el *enhancer* de los LTR (y por tanto no tienen capacidad de transactivación), así como el uso de promotores internos con actividad débil o moderada pueden ser ventajosos desde el punto de vista de la seguridad (Nienhuis et al. 2006, Hacein-Bey-Abina et al. 2014).

### **2.5. Terapia génica y respuesta inmune**

Además de los riesgos de la terapia génica comentados en el apartado anterior hay otro aspecto a tener en cuenta en los ensayos de terapia génica: la posible inmunogenicidad del vector y/o del transgén. En la terapia génica *ex vivo*, como es la hematopoyética, los propios transgenes constituyen una fuente potencial de antígenos ya que en principio los componentes del vector no entran en contacto con el sistema inmune de los pacientes, mientras que las proteínas codificadas por el gen terapéutico pueden contener epítomos que las células inmunitarias del huésped no reconozcan como propios, provocando así una respuesta inmune contra éstos o contra las células que los expresen (Latta-Mahieu et al. 2002, Yuasa et al. 2002, Nayak and Herzog 2010). La inmunogenicidad de los productos de los transgenes depende de varios factores, entre los que se encuentran la vía de administración, el tejido diana, el tipo de vector usado, la dosis o el nivel de expresión del transgén, la estructura molecular del producto del transgén, el tipo de mutación subyacente y factores de susceptibilidad individual (factores genéticos, MHC, el repertorio de linfocitos, exposición previa a antígenos) que determinan un mayor o menor riesgo de inmunogenicidad.

Actualmente se acepta que la expresión de transgenes en el sistema hematopoyético puede inducir tolerancia inmunológica frente a éstos en el contexto de un trasplante de CMHs modificadas genéticamente tras un acondicionamiento mieloablativo o parcialmente mieloablativo (Bagley et al. 2002, Gunthart and Kearns-Jonker 2007). Sin embargo, esto no siempre es así y se han descrito casos de inmunogenicidad frente a productos de transgenes en algunos modelos preclínicos, tanto en ratones como en perros y en primates no humanos (Lutzko et al. 1999, Bubnic et al. 2005). En nuestro laboratorio también hemos descrito que niveles altos de expresión del transgén en el sistema hematopoyético murino pueden ser determinantes en la inducción de respuestas inmunes frente al transgén y provocar el rechazo de las células que lo expresan, incluso en contextos parcialmente mieloablativos (Eixarch et al. 2009).

## Introducción

Todos estos aspectos se deben tener en cuenta cuando se diseña un ensayo de terapia génica, sobre todo en pacientes a los que se les va a infundir o trasplantar las células modificadas genéticamente en contextos de poca o nula mieloablación y/o inmunosupresión.

### 3. TOLERANCIA INMUNOLÓGICA

La tolerancia inmunológica es un estado fisiológico en el que el sistema inmune no genera una respuesta frente a un antígeno específico propio o extraño, aunque a diferencia de la anergia, sí puede hacerlo frente a otros antígenos. Esta ausencia de respuesta está controlada por varios mecanismos moleculares y celulares que actúan durante el desarrollo del sistema inmune y tras la exposición a antígenos.

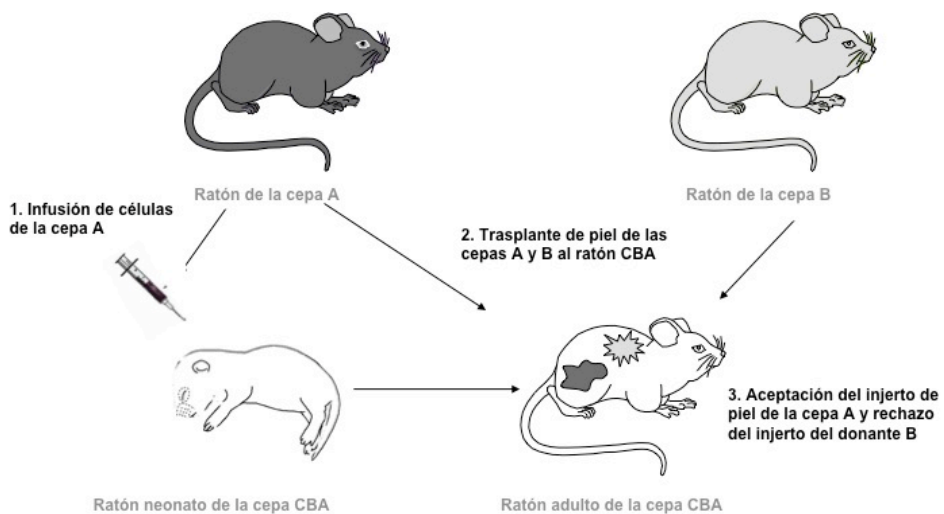
La tolerancia inmunológica es un proceso de vital importancia para evitar respuestas inmunes frente a antígenos extraños no peligrosos (partículas que inhalamos, alimentos que ingerimos), a los que estamos expuestos diariamente, y para evitar que se desencadene una respuesta frente a antígenos propios que pueda provocar una enfermedad autoinmune. Por estos motivos la tolerancia inmunológica se está creando y modificando de forma continua en el individuo, al igual que el sistema inmune que continuamente se adapta y guarda memoria de las infecciones que sufre el individuo durante su vida, funciones propias todas ellas del sistema inmune adaptativo o adquirido.

En función del lugar donde se produce, la tolerancia inmunológica se puede clasificar en:

- **Tolerancia central:** tiene lugar en los órganos linfoides primarios (timo y MO) durante el proceso de maduración de los linfocitos y se produce fundamentalmente por mecanismos de delección de clones que reconocen antígenos propios (autoantígenos).
- **Tolerancia periférica:** se produce en los órganos linfoides secundarios y en otros tejidos periféricos como consecuencia de unos niveles insuficientes de

coestimulación o por una activación persistente y repetitiva por antígenos en la periferia.

La tolerancia inmunológica frente a antígenos propios se adquiere muy precozmente en el desarrollo del sistema inmune. Ya en los años 50 del pasado siglo, Peter Medawar realizó una serie de experimentos en los que demostró que la exposición de ratones neonatos a células alogénicas se asociaba a tolerancia específica frente a estas en la vida adulta (Figura 8) (Billingham et al. 1953), descubrimiento que le valió la concesión del Premio Nobel de Medicina en 1960.



**Figura 8 - Esquema del experimento realizado por Medawar y colaboradores.** Se inyectaron células de la cepa A de ratón a ratones neonatos de la cepa CBA. Cuando éstos alcanzaron la edad adulta recibieron injertos de piel de las cepas alogénicas A y B. El injerto de piel de la cepa B fue rechazado, mientras que el de la cepa A fue tolerado por los receptores.

### 3.1. Mecanismos de tolerancia

En la inducción de tolerancia intervienen distintos mecanismos: delección, anergia, ignorancia clonal y supresión. Cada uno de ellos puede intervenir en cualquiera de los

## **Introducción**

dos tipos de tolerancia que existen (central y periférica). Los mecanismos de supresión intervienen tanto en la regulación de la respuesta inmune como en el mantenimiento de la tolerancia (Tabla 5).

**Tabla 5: Tipos y mecanismos de tolerancia inmunológica**

Linfocito	Tipo	Mecanismo
Linfocito T	Central	Delección Clonal
	Periférica	Ignorancia Clonal Anergia Clonal Supresión
Linfocito B	Central	Delección Clonal
	Periférica	Anergia Clonal

### ***a. Tolerancia central***

Los mecanismos de tolerancia central son los que operan en los órganos linfoides primarios (timo y MO).

El mecanismo principal, tanto para la tolerancia de células T como B, es la delección clonal. Este proceso se caracteriza por la inducción de apoptosis de aquellos clones autoreactivos, es decir, clones que reconocen específicamente antígenos propios.

En el caso de los linfocitos T, la delección clonal tiene lugar en el timo durante el proceso de maduración. Una vez los linfocitos pre-T (linfocitos T inmaduros) generados en la MO llegan al timo se inicia el reordenamiento génico del receptor de la célula T (TCR), para generar el repertorio de clones T, y expresan los dos co-receptores CD4 y CD8, convirtiéndose en una población doble positiva.

Cuando los linfocitos T inmaduros han adquirido el CD4, el CD8 y el TCR se inician los procesos de selección con el fin de conservar los clones T útiles y eliminar aquellos que sean potencialmente nocivos generando así el repertorio de linfocitos T específicos

que tendrá el individuo. El primero de los dos procesos de selección que se produce en la maduración de los linfocitos T es la selección positiva. Este proceso tiene lugar en la zona cortical del timo, donde los linfocitos T inmaduros reconocerán las moléculas del MHC (clase I y II) expresadas por las células epiteliales tímicas. Sólo las células T que sean capaces de unirse a moléculas del MHC cargadas de antígenos con una afinidad determinada recibirán señales de supervivencia y serán seleccionadas positivamente.

Los clones T que hayan pasado la fase de selección positiva tendrán que realizar el segundo y último proceso de selección conocido como selección negativa. En este, las células T que reconocen y se unen con gran afinidad a las moléculas del MHC, presentes en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APCs) tímicas (células dendríticas (DCs) o epiteliales de la zona medular del timo), que presentan los autoantígenos serán eliminadas por apoptosis (Figura 11). De esta manera se estima que sólo el 1-3% de los timocitos sobreviven a ambos procesos de selección y salen de él como células T maduras.

Las células B se generan y maduran en la MO, donde reordenan sus receptores y, al igual que las células T, sufren un proceso de selección negativa o deleción clonal, es decir que aquellos clones que reconozcan los autoantígenos presentados en las membranas de las APCs serán eliminados. Este proceso de deleción clonal es menos estricto que el que sufren las células T durante su maduración tímica.

Esta menor eficiencia de la deleción clonal en el caso de las células B y la posibilidad de que clones T autoreactivos de baja afinidad puedan escapar a la selección negativa hacen necesaria la existencia de mecanismos de tolerancia periférica.

## Introducción

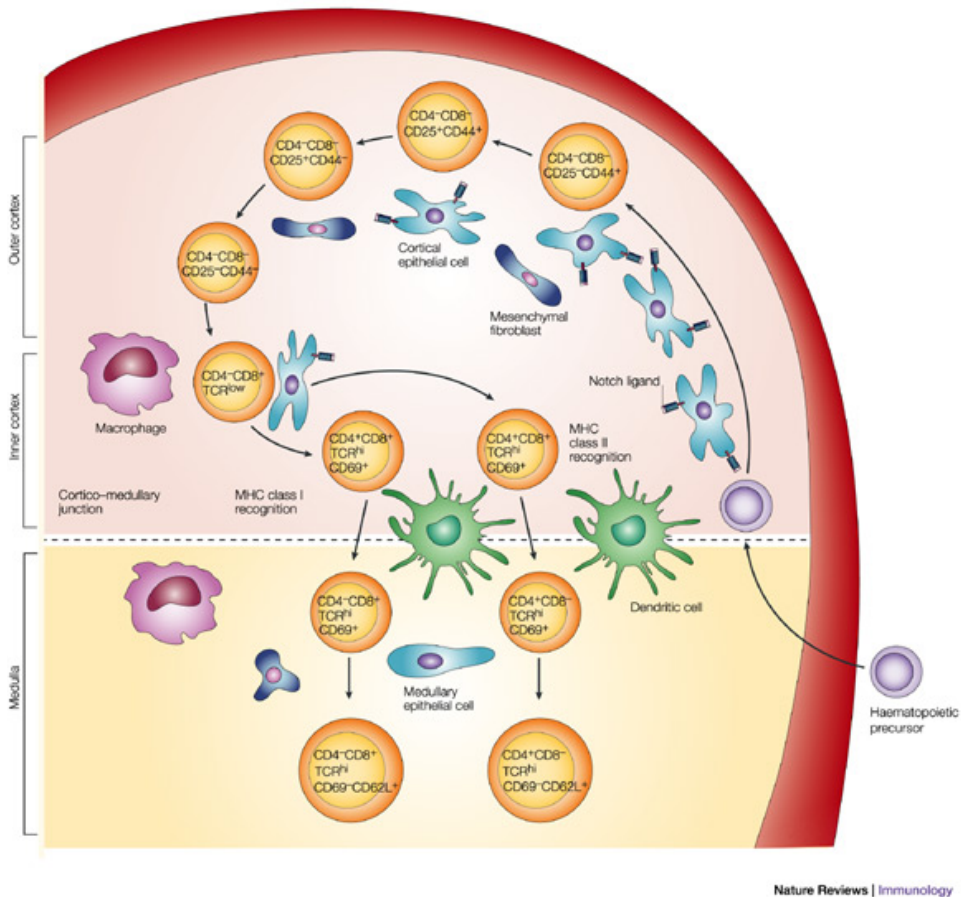


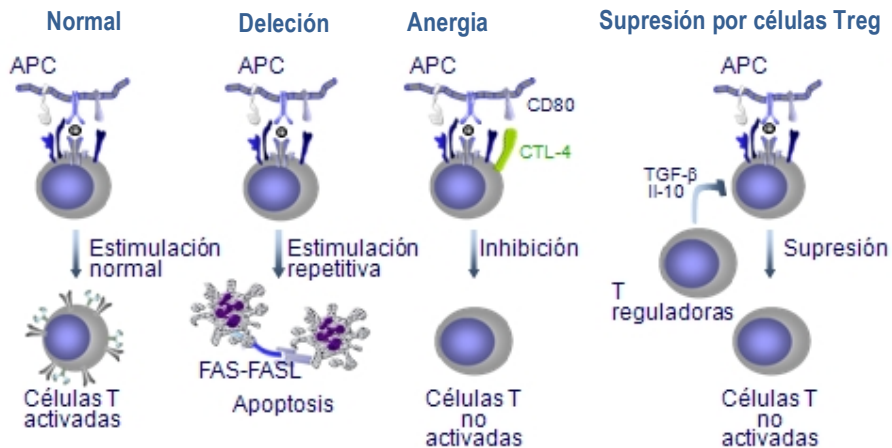
Figura 11 - Proceso de maduración de las células T en el timo (Zuniga-Pflucker 2004).

### b. Tolerancia periférica

Tal y como se ha comentado en el apartado anterior, los mecanismos de tolerancia periférica se responsabilizan de controlar las células autoreactivas que han escapado de los mecanismos de tolerancia central mediante la inducción de anergia, delección clonal, ignorancia clonal o supresión (Figura 12).

La ignorancia clonal es un mecanismo pasivo de tolerancia, en este caso las células T autoreactivas no reconocen o no responden a ciertos autoantígenos en la periferia debido a que entre ellos hay una barrera física que imposibilita la unión de la célula T efectora con la APC. La célula T puede encontrarse en el mismo tejido que el

autoantígeno pero no hay contacto con células que lo puedan presentar adecuadamente, bien sea por falta de expresión de moléculas del MHC o porque sus niveles de expresión son insuficientes para activar a las células T autoreactivas provocando una ausencia de respuesta y que se mantenga así la tolerancia inmunológica. Un ejemplo son los autoantígenos presentes en las células del cristalino.



**Figura 12 – Tipos de tolerancia en células T.** Las formas más frecuentes de inducción de tolerancia periférica en linfocitos T son: delección, inducción de apoptosis debido a un estímulo repetitivos y mediada por Fas-Fas ligando; anergia, ausencia de respuesta mediada por CTLA-4 y supresión, inhibición de la activación mediada por células Treg.

La anergia es el proceso por el que una célula autoreactiva sufre una activación incompleta, después de reconocer autoantígenos, debido a una falta de señales coestimuladoras. Para las células B autoreactivas, la anergia consiste en la ausencia de estímulo por parte de células T cooperadoras en el momento en que las células B reconocen dichos autoantígenos. En el caso de las células T, la anergia se produce cuando después de reconocer el complejo antígeno-MHC (primera señal de activación) no se da la segunda señal mediada por la unión de la célula T a las moléculas de coestimulación B7.1 y B7.2 (también conocidas como CD80 y CD86) expresadas por las APCs activadas, provocando así una activación incompleta (Appleman and Boussiotis 2003). La vía coestimuladora mejor caracterizada es la de la molécula de superficie CD28 de la célula T y su unión a CD80 y CD86 en las APCs. El reconocimiento del

## **Introducción**

complejo antígeno-MHC presentado por una APC inmadura que no expresa moléculas de coestimulación, o bien la expresión de la molécula inhibidora CTLA-4 en la superficie de la célula T en lugar de CD28, hace que la célula T entre en estado de anergia.

Las células T, además de la delección clonal que sufren en el timo, también pueden ser delecionadas en la periferia mediante la expresión en su superficie de Fas. La unión de esta molécula a su señal (Fas-L) induce apoptosis en la célula que expresa Fas (en este caso la célula T). La expresión de Fas puede estar inducida por una estimulación persistente de las células T.

La supresión de la activación de los linfocitos T es un mecanismo de tolerancia activo, dominante, que está mediado por células T reguladoras y que generalmente requiere del contacto célula-célula. El concepto de célula T reguladora aparece alrededor de inicios de los años 70 (Gershon and Kondo 1970) En sus inicios se describieron como linfocitos T con funciones supresoras, pero no fue hasta mediados de los años 90 que se empezaron a nombrar como células T reguladoras (Sakaguchi et al. 1995).

Las células T reguladoras (Treg) pueden ser CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>. Las células reguladoras CD4<sup>+</sup> se pueden clasificar en células Treg naturales (nTreg) o inducidas (iTreg) y se diferencia principalmente por cómo y donde se generan. Las células nTreg se generan en el timo después de la selección positiva-negativa, en cambio las células iTreg se generan en los órganos linfoides periféricos, donde células T CD4<sup>+</sup> convencionales que han sido estimuladas por diversos antígenos en diferentes condiciones acaban dando lugar a las iTreg. En conjunto, ambos tipos de células Treg establecen un equilibrio inmunológico que permite mantener una tolerancia periférica suprimiendo la autoinmunidad (Miller et al. 1992).

Las células nTreg se caracterizan por la expresión de los marcadores linfocitarios de superficie CD4 y CD25 y por la expresión del factor de transcripción FoxP3. Dentro de las iTreg se han descritos dos subpoblaciones, las Tr1 son CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>-</sup> y se

caracterizan por la secreción de IL-5, IL-10 y TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante  $\beta$ ) (Groux et al. 1997) y las Th3 que son CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> y se caracterizan por la secreción de TGF- $\beta$  (Weiner 2001). Las células iTreg se generan en la periferia de forma antígeno-específica, hay diferentes factores que pueden intervenir en su generación, incluyendo antígenos y vías de presentación, citocinas, factores específicos de tejido y APCs.

Las células Treg fueron descubiertas por su habilidad de suprimir de una forma dominante la respuesta inmune e inducir tolerancia periférica en diversas patologías y en condiciones fisiológicas. Son capaces de inhibir diferentes niveles de la actividad de la célula diana, proliferación, diferenciación, etc., para lo que utilizan diferentes mecanismos de supresión que podemos clasificar en tres grupos: i) contacto célula-célula, ii) factores supresores solubles y iii) competición (Scheffold et al. 2007). Los mecanismos de supresión que usan las células Treg para realizar su función son diversos y ninguno es más importante que los demás, sino que es la combinación de todos ellos lo que produce el efecto supresor característico de este tipo celular.

### **3.2. Presentación de antígenos**

Para que los linfocitos T reconozcan antígenos, éstos deben ser presentados en la superficie de las células unidos a moléculas de MHC. Este proceso sólo se produce durante la respuesta inmune adaptativa.

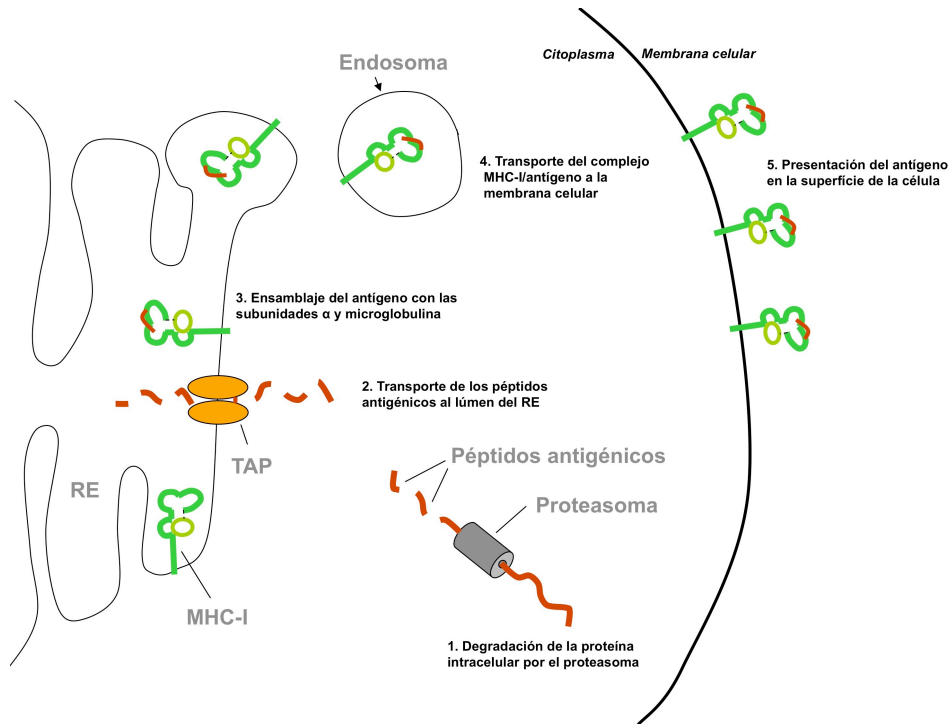
Los antígenos pueden ser lipopolisacáridos, lipoproteínas, glicoproteínas o péptidos. Las células T no reconocen los antígenos solubles ni moléculas intactas sino péptidos antigénicos que se generan en el proteasoma a partir del procesamiento de proteínas y que se unen a las moléculas del MHC que se encuentran en la superficie celular. Existen dos tipos de moléculas MHC: de clase I (MHC-I) y de clase II (MHC-II), la diferencia fundamental que hay entre ellas es el tipo de antígenos que presentan, el tipo de células que las expresan y el tipo de células al que se dirigen. Las moléculas MHC-I se expresan en la superficie de la mayoría de la células nucleadas, se encargan de presentar

## **Introducción**

péptidos derivados de proteínas intracelulares, es decir, péptidos endógenos, a los linfocitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>). En cambio, las moléculas MHC-II sólo se expresan, en condiciones fisiológicas, en APCs, que incluyen a las DCs, los linfocitos B y los Mφs. Las APCs presentan péptidos extracelulares o exógenos a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> unidos a moléculas de clase II.

### ***a. Presentación de antígenos intracelulares: vía del MHC de clase I***

Los antígenos presentados por la vía del MHC-I que inducen respuestas inmunitarias proceden generalmente de patógenos intracelulares como los virus o de proteínas aberrantes en el caso de células cancerosas. Las moléculas del MHC-I son heterodímeros formados por dos cadenas polipeptídicas. La cadena pesada o cadena  $\alpha$  tiene un tamaño de 47 kD, en ratón, y la cadena  $\beta$  (o  $\beta_2$ -microglobulina), que no está codificada en la región MHC, tiene un tamaño de 12 kD. Las moléculas del MHC-I son las encargadas de unirse a los antígenos endógenos y presentarlos en la superficie de la célula. Las proteínas (patogénicas o aberrantes) sintetizadas intracelularmente son degradadas por el proteasoma en péptidos de 8 a 11 aa que son transportados al lumen del retículo endoplasmático por las proteínas del transportador asociado al procesamiento de antígenos (TAP). Allí, los péptidos antigénicos se ensamblan con las dos subunidades del MHC-I (sintetizadas en el retículo endoplasmático rugoso); la molécula del MHC-I cargada con el péptido antigénico es transportada hasta la membrana celular para presentar el antígeno en la superficie de la célula (Figura 9). A través del TCR, las células T CD8<sup>+</sup> reconocen específicamente al complejo MHC-I/antígeno y, en presencia de las señales coestimuladoras adecuadas, se activan y adquieren capacidad efectora, desencadenándose la denominada respuesta T citotóxica que resulta en la lisis de las células que están presentando el citado antígeno. En ausencia de coestimulación, no se produciría esta activación y se inducirían mecanismos de tolerancia.



**Figura 9 - Presentación de antígenos intracelulares por la vía del MHC de clase I.** Una vez la proteína ha sido degradada por el proteasoma, los péptidos antigénicos entran en el retículo endoplasmático. Allí, si encuentran alguna molécula del MHC-I con la afinidad adecuada se unen a ella. Finalmente el complejo MHC-I/antígeno es transportado a la superficie de la célula. MHC-I: molécula del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I; RE: retículo endoplasmático; TAP: transportador asociado al procesamiento de antígenos.

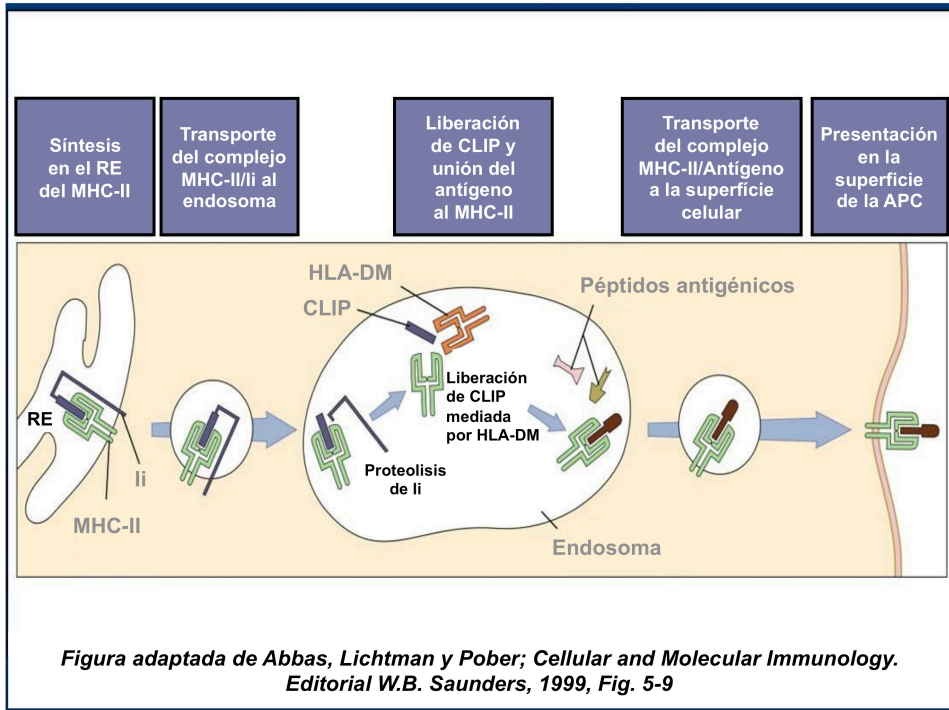
**b. Presentación de antígenos exógenos: vía del MHC de clase II**

Como ya se ha comentado, los antígenos exógenos o extracelulares son presentados por moléculas del MHC-II. Generalmente los antígenos exógenos son moléculas solubles como toxinas (que son endocitadas por las APCs) o provienen de patógenos extracelulares. A diferencia de las moléculas del MHC-I que son de expresión ubicua, las del MHC-II sólo se expresan en las APCs, ya sea espontáneamente (DCs, linfocitos B) o previa inducción por determinados factores como el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (M $\phi$ s). El endosoma se acidifica, activando a proteasas que degradan las proteínas en pequeños péptidos. A diferencia de las moléculas del MHC-I, las del MHC-II se unen a

## **Introducción**

péptidos más grandes, de entre 12 y 34 aa, aunque el tamaño idóneo para la mayoría de moléculas de clase II es de 12 a 17 aa. Por otro lado, la molécula del MHC-II, formada por dos cadenas polipeptídicas polimórficas (cadena  $\alpha$  y  $\beta$ ), se sintetiza y se ensambla en el retículo endoplasmático. Al dímero  $\alpha\beta$  se le une al mismo tiempo una proteína denominada cadena invariante (Ii o CD74). La Ii es una proteína integral de la membrana celular que contiene tres dominios: en la Ii murina, el dominio N-terminal es corto, de 30 aa, la región transmembranal la forman 24 aa y el dominio intraluminal, el más largo, lo componen 150 aa. Tres dímeros  $\alpha\beta$  se unen secuencialmente a un trímero de Ii para posteriormente abandonar el retículo endoplasmático. Tras pasar por el aparato de Golgi, el complejo  $(\alpha\beta Ii)_3$  es transportado al compartimento endocítico.

Las vesículas que contienen los péptidos antigénicos resultantes de la proteólisis y las vesículas que contienen las moléculas del MHC-II finalmente se fusionan (Cresswell 1994). A diferencia de las moléculas del MHC-I, las del MHC-II son transportadas al compartimento endocítico sin un péptido cargado. La Ii, además de dirigir el transporte de las moléculas del MHC-II al endosoma (la señal de localización endocítica está situada en el dominio citoplasmático de la Ii), tiene como función evitar la unión prematura o aberrante de antígenos a la hendidura del MHC-II. En el compartimento endocítico, la Ii es degradada por unas proteasas denominadas catepsinas, hasta que sólo queda un pequeño fragmento unido a la hendidura de la molécula del MHC-II. Este pequeño fragmento, denominado CLIP (péptido asociado a la cadena invariante de las moléculas MHC-II), se libera finalmente de la hendidura del MHC-II por interacción con el dímero  $\alpha\beta$  HLA-DM (en humanos) o H2-M (en ratón), dejando libre la hendidura del MHC-II para que se le puedan unir los péptidos antigénicos de la afinidad adecuada, y se presenten en la superficie de la célula (Neefjes et al. 1990, Roche and Cresswell 1991) (Figura 10).



**Figura 10 - Presentación de antígenos extracelulares por la vía del MCH de clase II.**

CLIP: péptido asociado a la Ii de las moléculas MHC-II; Ii: cadena invariante; MHC-II: molécula del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II; RE: retículo endoplasmático; HLA-DM: antígeno leucocitario humano DM.

Estas características de la Ii han hecho que se haya utilizado para dirigir secuencias de interés (p.e. que codifiquen para péptidos antigénicos) hacia el compartimiento del MHC de clase II, garantizando una presentación eficiente por dicha vía de presentación antigénica (Carstens et al. 2000, Bischof et al. 2001, Lange et al. 2009).

Las células T CD4+ reconocen específicamente el complejo MHC-II/péptido antigénico, pero sólo se activan si además se dan las señales de coestimulación adecuadas. Según el tipo de estímulo recibido, se pueden diferenciar distintas subpoblaciones de células T CD4+: Th1, Th2, Th17, Tfh (célula T colaboradora folicular), Th9, Th22 y Treg (Sun and Zhang 2014), que se corresponden con otros tantos tipos de respuesta inmune. La secreción de interleucina-12 (IL-12) estimula la activación de las células Th1. Estas están implicadas en la inmunidad celular, mientras que las células Th2, estimuladas por

## **Introducción**

la IL-4, son esenciales en la inmunidad humoral mediada por los linfocitos B. La subpoblación Th17, debe su nombre a la IL-17, citocina efectora de este subtipo celular (Aggarwal et al. 2003, Langrish et al. 2005); (Rouvier et al. 1993, Yao et al. 1995). Es una subpoblación que se cree implicada en procesos inflamatorios y a la que se atribuye un papel importante en diversas enfermedades alérgicas y autoinmunes (Matusevicius et al. 1999, Barczyk et al. 2003, Cua et al. 2003, Fujino et al. 2003, Murphy et al. 2003, Witowski et al. 2004, Langrish et al. 2005). Finalmente, las células Treg inhiben la respuesta tanto humoral como celular mediada por el resto de células efectoras del sistema inmune.

### **3.3. Autoinmunidad y pérdida de tolerancia**

Los diversos mecanismos de tolerancia central y periférica contribuyen en conjunto a que en situaciones fisiológicas el sistema inmune no reaccione frente a antígenos propios, pero estos mecanismos pueden fallar. Cuando se rompe la tolerancia pueden aparecer enfermedades autoinmunes no órgano-específicas como el lupus eritematoso sistémico, u órgano-específicas como la artritis reumatoide, la diabetes tipo I o la EM, entre otras.

La tolerancia puede llegar a perderse por muy diversos motivos. Se ha demostrado que el nivel de expresión de los autoantígenos en el timo es un factor importante en el desarrollo de tolerancia frente a éstos (Liston et al. 2005, Taubert et al. 2007). A nivel periférico, fenómenos como el daño tisular pueden exponer antígenos normalmente inaccesibles en un contexto inflamatorio y también facilitar que células autoreactivas entren en contacto con el antígeno y desencadenar una respuesta inmune. Por otro lado, los superantígenos, generalmente de origen bacteriano, son capaces de activar un gran número de clones de células T o B, incluyendo clones autoreactivos que permanecían en estado de ignorancia o anergia en la periferia. Por último, un linfocito puede reconocer un antígeno derivado de un patógeno que tenga similitud estructural con un antígeno

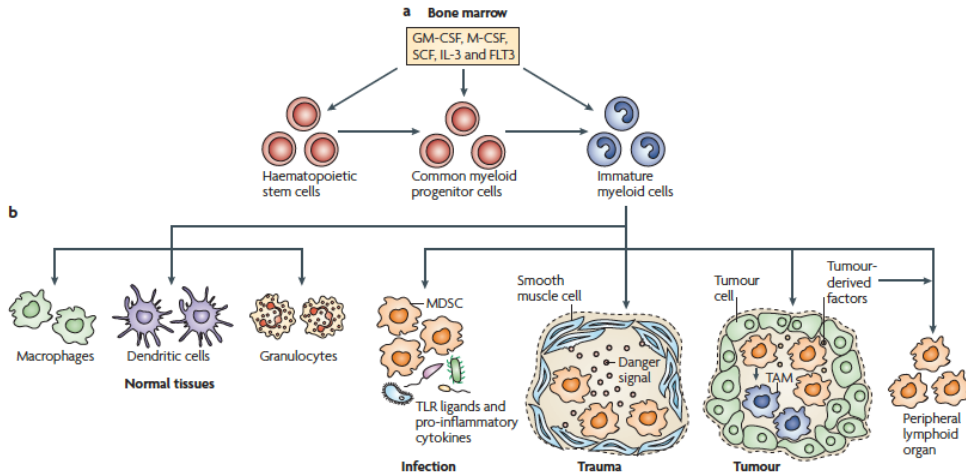
propio (mimetismo molecular) y desencadenar una respuesta cruzada frente a este, lo que podría originar una enfermedad autoinmune.

#### **4. CÉLULAS MIELOIDES SUPRESORAS**

Las células mieloides supresoras (MDSCs, del inglés *Myeloid-Derived Suppressor Cells*) constituyen una población heterogénea de células de estirpe mielóide más o menos inmaduras que tiene la capacidad de suprimir la respuesta de las células T. En condiciones normales, durante la mielopoyesis, las CMHs darían lugar a células mieloides inmaduras (IMCs) que migrarían a los órganos linfoides periféricos y madurarían dando lugar a Mφs, DCs y granulocitos. En condiciones patológicas como el cáncer, las infecciones o procesos inflamatorios crónicos, se puede producir un bloqueo de la maduración de las IMCs, que se acumularían en los órganos linfoides periféricos, donde adquirirían la capacidad de suprimir respuestas inmunes adaptativas, convirtiéndose así en MDSCs (Figura 13) (Gabrilovich and Nagaraj 2009).

La heterogeneidad de esta población hace que no haya un fenotipo único para las MDSCs, sino que depende del modelo animal, de cada situación particular o del tipo de muestra a estudiar, lo que complica el análisis y caracterización de estas células y obliga a realizar ensayos funcionales. A pesar de esta heterogeneidad, en los diferentes estudios realizados se han descrito algunos marcadores fenotípicos que ayudan a definir y caracterizar las MDSCs. En el ratón, las MDSCs se caracterizan por expresar marcadores de linaje mielóide, como el CD11b (Mac-1) y Gr-1, y por presentar bajos niveles de F4/80 y CD124 (IL4R $\alpha$ , la cadena  $\alpha$  del receptor de la IL-4 e IL-13). En humanos, las MDSCs aún tienen un fenotipo peor definido.

## Introducción

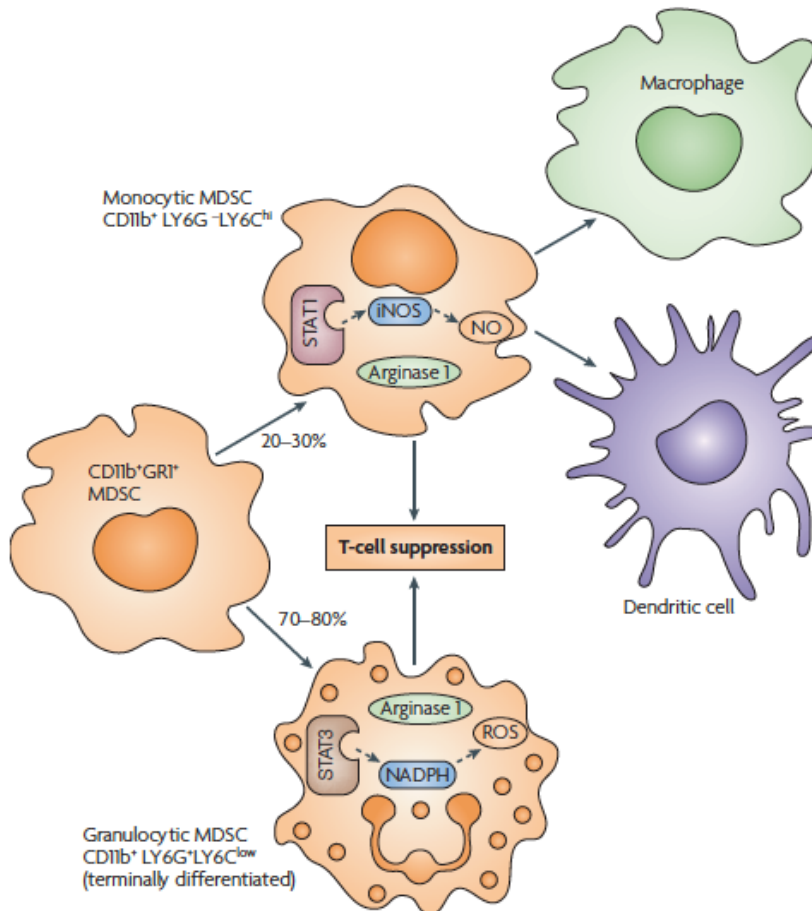


**Figura 13 - Esquema del origen y lugar de acumulación de las MDSCs.**  
*Imagen obtenida de (Gabrilovich and Nagaraj 2009).*

Dentro de esta población podemos diferenciar dos subpoblaciones basándonos en la expresión diferencial de dos epítomos Ly6G y Ly6C (ambos reconocidos por el anticuerpo monoclonal anti-Gr-1, pero codificados por dos genes distintos). Así, podemos distinguir entre una subpoblación granulocítica ( $CD11b^+ Ly6G^+ Ly6C^{low}$  o  $CD11b^+ Gr-1^{high}$ ) y otra monocítica ( $CD11b^+ Ly6G^- Ly6C^{hi}$  o  $CD11b^+ Gr-1^{low}$ ) (Figura 14) (Wong et al. 2008, Ostrand-Rosenberg and Sinha 2009).

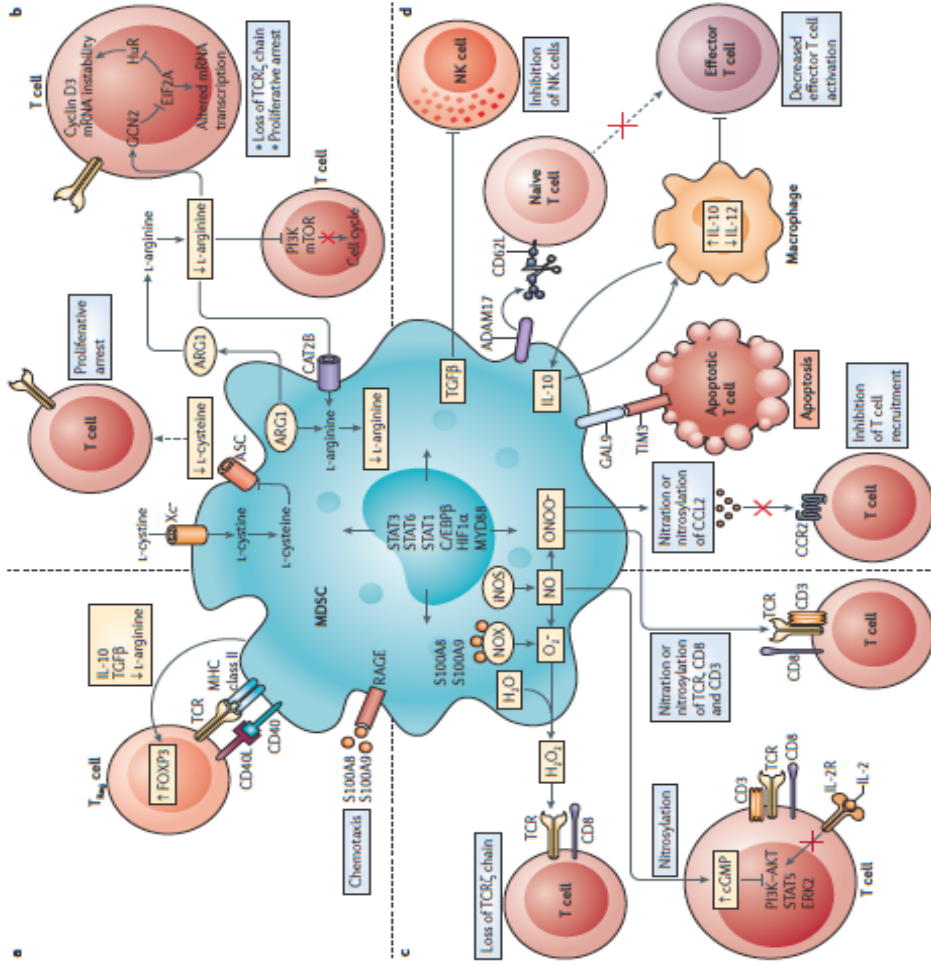
Los mecanismos de supresión de la respuesta T por parte de las MDSCs se basan fundamentalmente en la sobreexpresión de arginasa-1 y de los enzimas implicados en la producción de óxido nítrico (NO), como la forma inducible de la NO sintetasa (iNOS), así como por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), provocando una disminución de L-arginina y un aumento de ROS en el medio, entre otros. La L-arginina es un aa esencial para la proliferación de las células T y para la síntesis de la cadena  $\zeta$  del CD3, por lo que su depleción inhibe la expresión de esta, la proliferación de las células T e induce su apoptosis (Rodríguez et al. 2004, Rodríguez et al. 2007). Aunque se ha descrito que la actividad inmunosupresora de las MDSCs requiere del contacto célula-célula, esta supresión puede ser antígeno-específica o no, dependiendo de si el

TCR de la célula T reconoce o no el complejo antígeno-molécula de MHC que se encuentra en la superficie de la MDSC.



**Figura 14 - Subpoblaciones de MDSCs.** Dentro de las MDSCs se pueden distinguir al menos dos subpoblaciones que se diferencian por la expresión diferencial de los epítomos Ly6C y Ly6G. Así, podemos diferenciar entre MDSCs monocíticas y MDSCs granulocíticas. Imagen obtenida de (Gabrilovich and Nagaraj 2009).

Cuando se da esta unión, la proximidad de la célula T a la MDSC hace que la producción de NO y ROS alteren el TCR y otras moléculas de superficie, alterando la afinidad o la especificidad del TCR y su capacidad de unión al antígeno (Figura 15) (Gabrilovich and Nagaraj 2009).



**Figura 15 - Mecanismos supresores de las MDSCs sobre los linfocitos T.**

Las MDSCs pueden inhibir de forma eficiente la respuesta de los linfocitos T mediante diversos mecanismos: a) Expansión de células Treg. b) Depleción de aminoácidos, como L-arginina y la L-cisteína, necesarios para el crecimiento y diferenciación de los linfocitos T. c) Producción de ROS. d) Supresión de la migración y viabilidad de las células T.

Los diferentes factores de estimulación (IL-4, IL-13, IFN-γ, IL-1β, factores tumorales) activan las STAT (del inglés Signal Transducer and Activator of Transcription) y promueven en las MDSCs la expresión de las enzimas Arg-1 e/o iNOS y de CAT. La L-arginina disminuye en el medio extracelular e inhibe la proliferación del linfocito T por la disminución de la expresión de IL-2R o la anergia del TCR (mediante el bloqueo de PI3K o de la ciclina D3). La urea, L-ornitina, L-citrulina y el ON producidos debido a la expresión de Arg-1 e iNOS, respectivamente, junto a los peroxinitritos y ROS, inducen la expresión de CD95L o TIM3 en el linfocito T que favorece su apoptosis mediante contacto celular directo. Además, la expresión variable de MHC-I y/o -II en la MDSCs induce la apoptosis del linfocito T de manera antígeno-específica. TLR (del inglés Toll like Receptor).

Imagen obtenida de (Gabrilovich et al. 2012)

Pese a los estudios que se están realizando actualmente para poder entender mejor la biología de las MDSCs, aún quedan aspectos por averiguar, entre ellos las señales que determinan su acumulación, expansión y activación. Actualmente se está trabajando en dos modelos: a) una única señal que diferenciaría las CMHs a MDSCs, b) dos señales, una que daría la señal de expansión de las CMHs a IMCs y la segunda activaría las IMCs convirtiéndolas en MDSCs. En el primer modelo estaría implicado un único factor que sería el GM-CSF, que diferenciaría las CMHs a MDSCs y activaría su función supresora. El segundo modelo estaría regulado por varios factores solubles y factores de transcripción que estarían implicados en la expansión o activación de las MDSCs. En el primer proceso (expansión) están implicados varios factores y citocinas como IL-6, Tpo, Flt3-L GM-CSF, M-CSF, G-CSF y VEGF, y factores de transcripción como STAT3 y STAT5 (Zhou et al. 2010, Condamine and Gabrilovich 2011). Estas señales previenen la maduración células mieloides y promueven la proliferación de IMCs, pero ellas solas no son suficientes para la acumulación y activación de las MDSCs.

Las MDSCs necesitan una segunda señal para activarse, que promueva el aumento de la arginasa-1 y de la iNOS y del resto de mecanismos de supresión de las MDSCs. En este segundo proceso estarían implicadas moléculas proinflamatorias como IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 e IL-13, el ligando del TCR y factores de transcripción como STAT1, NF- $\kappa$ B así como otros factores, entre ellos ciclooxigenasa-2 (Cox2) y prostaglandina E2 (PGE2) (Condamine and Gabrilovich 2011, Draghiciu et al. 2015).

Hace más de 20 años que las MDSCs se describieron en pacientes oncológicos donde se descubrió su participación en la inmunosupresión asociada a tumores. Desde entonces se ha observado que estas células no sólo se acumulan en los órganos linfoides en los diferentes modelos tumorales que se han estudiado sino que también pueden estar asociadas a diferentes procesos inflamatorios desencadenados por infecciones crónicas, autoinmunidad, traumatismos, etc. (Nicholson et al. 1995, Mendel et al. 1998, Okuda et al. 1999, Comabella et al. 2010). Los resultados obtenidos en los diferentes modelos sugieren que la expansión de estas células estaría interviniendo de

## **Introducción**

forma negativa en la regulación de la respuesta inmune y esta característica hace que las MDSCs se consideren una posible diana terapéutica (Correale et al. 2008, Drujont et al. 2014).

## **5. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES**

Las células madre mesenquimales (MSCs del inglés *Mesenchymal Stem Cells*, también conocidas como *Mesenchymal Stromal Cells*) son células no hematopoyéticas multipotentes que se pueden aislar de diversos tejidos como la MO (Friedenstein et al. 1966), el tejido graso o la placenta, entre otros (Barry and Murphy 2004). Aunque son unas de las células madre adultas más estudiadas y mejor caracterizadas, aún no se han encontrado marcadores fenotípicos totalmente específicos. Actualmente se identifican y aíslan en base a la presencia o ausencia de determinados marcadores de superficie, sus características de crecimiento en cultivo o por su capacidad de diferenciarse a diferentes linajes, como tejido óseo, adiposo, músculo liso y condral, aunque también se ha descrito la diferenciación a miocitos, cardiomiocitos o neuronas, entre otros. Finalmente, las MSCs cultivadas tienen una gran capacidad inmunosupresora (Noel et al. 2007).

Aunque el fenotipo de las MSCs varía dependiendo del tipo de tejido del que se hayan obtenido, todas ellas tienen la característica común de no expresar marcadores hematopoyéticos como el CD45 ni los marcadores de los diferentes linajes hematopoyéticos (Lin<sup>-</sup>), pero sí expresan otros marcadores como el CD29, CD44, CD90 y CD105, en el caso de las MSCs murinas, o los marcadores CD73, CD105, CD90 en el caso de las humanas (Chamberlain et al. 2007).

Las MSCs poseen propiedades inmunomoduladoras que podrían jugar un papel en el mantenimiento de la tolerancia periférica, el control de la autoinmunidad y la tolerancia feto-materna, entre otras (Dugast and Vanhove 2009). Se ha visto, mediante ensayos *in vitro*, que las MSCs tienen capacidad para suprimir la proliferación de células T (CD4<sup>+</sup> y

CD8+) y de inhibir la citotoxicidad de forma dosis dependiente. El efecto supresor está mediado por factores solubles secretados por las propias MSCs como TGF- $\beta$ , HGF (factor de crecimiento hepatocítico), IL-10, IL-6, indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO), PGE2 y NO, aunque los mecanismos por los que actúan no están del todo claros (Noel et al. 2007, Glenn and Whartenby 2014)

Esta capacidad inmunomoduladora de las MSCs las hace candidatas a ser usadas como terapia en enfermedades autoinmunes como la EM (Gharibi et al. 2015) y otros procesos inflamatorios como la EICH, donde se ha visto que la inyección de MSCs junto al tratamiento inmunosupresor habitual en pacientes con EICH aguda refractaria mejoraba el pronóstico y la evolución de la enfermedad (Yin and Li 2006).

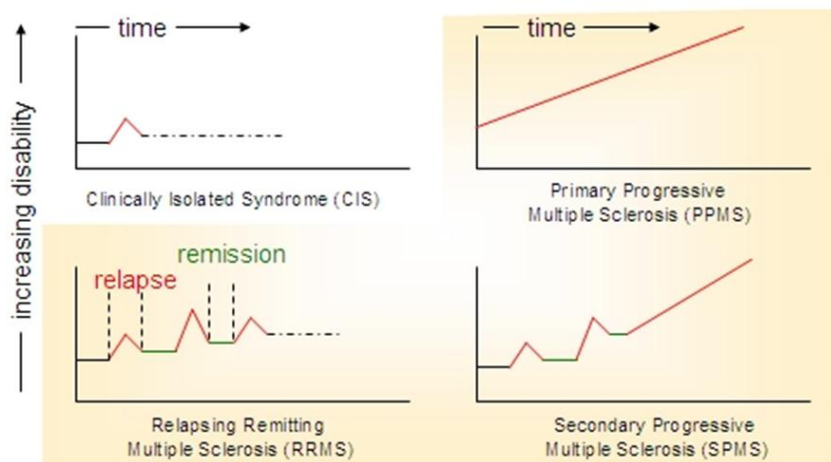
## **6. ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

La EM es una enfermedad crónica, inflamatoria y desmielinizante del sistema nervioso central (SNC), siendo la principal causa de discapacidad no traumática en adultos jóvenes. El debut de la enfermedad suele producirse entre los 20 y 40 años de edad, siendo más frecuente en mujeres que en hombres (relación 2-3:1).

La EM es una enfermedad heterogénea en la que se pueden diferenciar tres subgrupos clínicos principales. La mayoría de los pacientes (80-90%) desarrollan una forma remitente-recurrente (EMRR) caracterizada por la aparición de brotes de empeoramiento clínico indicativos de nuevos procesos inflamatorios, separados por periodos de remisión total o parcial de los síntomas y signos clínicos. El 50% de estos pacientes acaban, tras un periodo de 10-15 años, desarrollando una forma progresiva de la enfermedad denominada secundariamente progresiva (EMSP). Finalmente, un 10-20% de los pacientes desarrollan una forma progresiva desde el inicio de la enfermedad (forma primariamente progresiva o EMPP) y sin remisión de la sintomatología (Lublin and Reingold 1996). Actualmente hay una nueva clasificación (Lublin et al. 2014) que aparte de los tres subgrupos descritos añade un cuarto grupo clínico denominado

## Introducción

síndrome neurológico aislado (SNA), la nueva clasificación considera el SNA como la primera manifestación clínica de la enfermedad, pues posee parámetros de inflamación y desmielinización compatibles con la EM a pesar de no cumplir los criterios clínicos ni radiológicos de diseminación en el tiempo y el espacio (necesarios para considerarse la EM clínicamente definida, EMCD). Cabe destacar que la mayoría de los pacientes con SNA acaban evolucionando a una EMCD (Miller et al. 2012) (Figura 16).



**Figura 16 - Cursos clínicos de la EM.** Según la clasificación de Lublin (2014) se pueden diferenciar varios subgrupos clínicos: síndrome neurológico aislado (SNA o CIS del inglés Clinically Isolated Syndrome), remitente-recurrente (RR), secundariamente progresiva (SP), primariamente progresiva (PP).

Imagen obtenida de: Diagnostic Signature Challenge - MS Stage Sub-Challenge. <https://sbvimprover.com>.

La EM se considera una enfermedad esencialmente mediada por células T CD4<sup>+</sup> específicas frente a antígenos de la vaina de mielina, aunque también participan otras poblaciones celulares del sistema inmunitario.

La etiología de la EM es desconocida, se piensa que en el desarrollo de la enfermedad intervienen tanto factores genéticos como factores ambientales, que podrían estar implicados en la pérdida de la tolerancia frente a antígenos propios y en el inicio de la respuesta autoinmune (Oksenberg and Baranzini 2010). Además de las causas,

tampoco se conocen cuáles son los antígenos de la mielina que son diana de la respuesta inmune. La vaina de mielina es una estructura proteolipídica que recubre los axones con el objetivo de acelerar la transmisión de los impulsos nerviosos. Está compuesta por una fracción lipídica (75%) y una proteica (25%). Esta estructura compleja contiene numerosos autoantígenos potenciales que pueden ser diana de la respuesta autoinmune característica de la enfermedad. Los principales autoantígenos candidatos derivan de la fracción proteica y son la proteína mielínica básica (MBP), la proteína proteolipídica (PLP) y la glicoproteína mielínica de los oligodendrocitos (MOG). Estos autoantígenos candidatos se han utilizado para desarrollar el modelo animal de la EM, la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE).

### **6.1. La encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)**

La EAE es una enfermedad experimental autoinmune y desmielinizante del SNC que sirve como modelo de la EM ya que comparte con esta características clínicas, patogénicas e histopatológicas (Lassmann and Wisniewski 1979, Wekerle et al. 1994). Las primeras descripciones se hicieron en los años 30 al comprobar que la inyección de extractos del SNC en animales susceptibles les inducía una enfermedad parecida a la EM (Rivers et al. 1933, Kabat et al. 1946).

#### **a. Inducción de la EAE**

La EAE se induce experimentalmente en especies susceptibles tales como roedores, lagomorfos y primates, ya sea mediante una inmunización activa o por transferencia pasiva. En la inmunización activa se inyectan subcutáneamente (s.c.) o intradérmicamente una suspensión de homogeneizado de SNC, mielina, proteínas de la mielina, péptidos o antígenos mielínicos autólogos o heterólogos emulsionados en un adyuvante (Paterson 1960). En la transferencia pasiva se inyectan intravenosamente (i.v.) células T específicas frente a antígenos de la mielina, procedentes del bazo o de los ganglios linfáticos de animales inmunizados activamente, lo que por otra parte

## **Introducción**

demuestra la implicación del sistema inmune en la patogenia de la enfermedad (Pettinelli and McFarlin 1981, Mokhtarian et al. 1984, van der Veen et al. 1989, Sun et al. 2001).

- ***Susceptibilidad***

Inicialmente los experimentos de EAE se realizaron en monos (Rivers et al. 1933, Kabat et al. 1946, Kabat et al. 1949) pero posteriormente se extendió el uso de roedores, cobayas y conejos (Zamvil and Steinman 1990). No todas las especies animales ni todas las cepas son igualmente susceptibles a la EAE. Estas diferencias en la susceptibilidad suelen ser atribuidas a la dotación genética de la cepa y a los polimorfismos existentes en los antígenos del MHC-II y del TCR, principalmente (Zamvil and Steinman 1990, Dahlman et al. 1999, Roth et al. 1999), aunque también se han implicado otros factores como las hormonas, la edad, el sexo, el antígeno utilizado, etc. (Moreno et al. 2012).

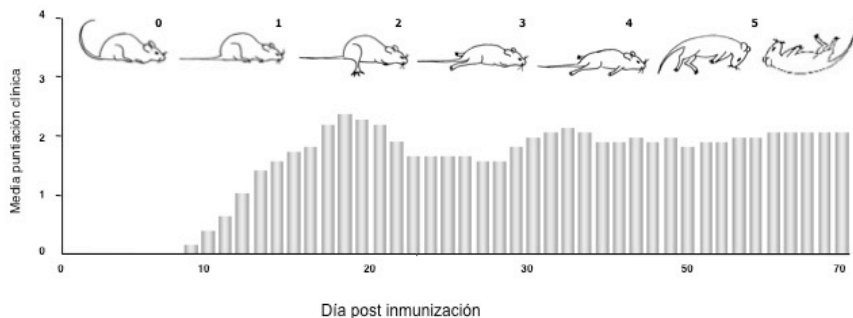
- ***Antígenos***

Desde los años 40 hasta la actualidad se han utilizado diferentes fuentes de antígenos de la mielina para inducir activamente la enfermedad. Inicialmente se utilizó un homogeneizado de SNC (Kabat et al. 1946, Kabat et al. 1949). Gracias a los avances en las técnicas de purificación de proteínas se empezaron a usar proteínas purificadas de la mielina, principalmente MBP, PLP, MOG, aunque también se ha descrito la inducción de EAE con otras proteínas relacionadas con la mielina como la proteína mielínica básica asociada a los oligodendrocitos (MOBP) (Maatta et al. 1998, Holz et al. 2000, Kaye et al. 2000), la glicoproteína asociada a la mielina (MAG) (Weerth et al. 1999, Morris-Downes et al. 2002), la glicoproteína específica de los oligodendrocitos (OSP) (Stevens et al. 1999, Zhong et al. 2000, Morris-Downes et al. 2002) o la 2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa (CNPasa) (Maatta et al. 1998, Morris-Downes et al. 2002), presente en los oligodendrocitos. Actualmente se utilizan tanto las proteínas completas como péptidos derivados de estas. La utilización de péptidos ha permitido una mayor homogeneidad y reproducibilidad de los diferentes modelos de EAE y la utilización de cepas que eran resistentes a la inmunización con la proteína completa.

En resumen, la EAE es el resultado de la inmunización de una especie o cepa susceptible con un antígeno encefalitogénico específico. Las múltiples combinaciones tanto de especies y cepas como de antígenos dan lugar a una gran variedad de modelos diferentes de EAE.

### b. Curso clínico

Una vez realizada la inmunización, ya sea activa o pasiva, se produce la respuesta inmunitaria contra el autoantígeno del SNC, dando lugar a la aparición de una parálisis ascendente que empieza en la cola provocando paresia parcial o total de esta (flacidez) y se extiende causando paraparesia o paraplejía de los miembros posteriores, pudiendo llegar hasta una tetraparesia o tetraplejía que, en ocasiones, puede causar la muerte del animal (Figura 17). La pérdida de peso corporal precede a la aparición de los signos clínicos y esta se mantiene hasta que el animal se estabiliza o se recupera.



**Figura 17 – Ejemplo de patrón evolutivo de los signos neurológicos en ratones C57BL/6J inmunizados con el péptido 40-55 de la MOG.** El gráfico representa la puntuación clínica que se da a los diferentes grados de parálisis que se observan tras la inmunización. La puntuación clínica va desde la ausencia de signos clínicos (puntuación = 0) pasando por la paraplejía de los miembros posteriores (puntuación = 3) hasta la muerte del ratón a causa de la enfermedad (puntuación = 6)

Como se ha comentado anteriormente, podemos diferenciar distintos cursos clínicos de EAE según la especie o cepa y el antígeno encefalitogénico utilizados. Algunos ejemplos son la EAE aguda que se desarrolla en ratas Lewis y DA inmunizadas con la proteína MBP o péptidos derivados de esta y que se caracteriza por la aparición de un

## **Introducción**

único brote de enfermedad, que remite por completo (Stepaniak et al. 1997, Lenz et al. 1999). La EAE crónica remitente-recurrente es aquella en la que se observan dos o más brotes, y que se induce en ratones (aunque también se ha descrito en ratas) inmunizados con la proteína PLP o péptidos derivados (Polman et al. 1988). En la EAE no remitente, el curso clínico es progresivo (Figura 17) y se induce en ratones con dotación genética H-2<sup>b</sup> (C57BL/6) y en ratas inmunizadas con la proteína MOG (Mendel et al. 1995, Weissert et al. 1998). Aunque también se ha descrito este mismo curso en ratones con dotación genética H-2<sup>u</sup> inmunizados con la proteína MBP (Acha-Orbea et al. 1988, Wraith et al. 1989).

### ***c. Patogenia***

Los estudios realizados en el modelo animal han permitido conocer mejor la respuesta inmune implicada en la patogenia de la EM. Se han podido estudiar las diferentes subpoblaciones celulares que contribuyen al desarrollo de la enfermedad, así como los mecanismos de entrada de las células inflamatorias al SNC, los factores solubles o el propio proceso de desmielinización.

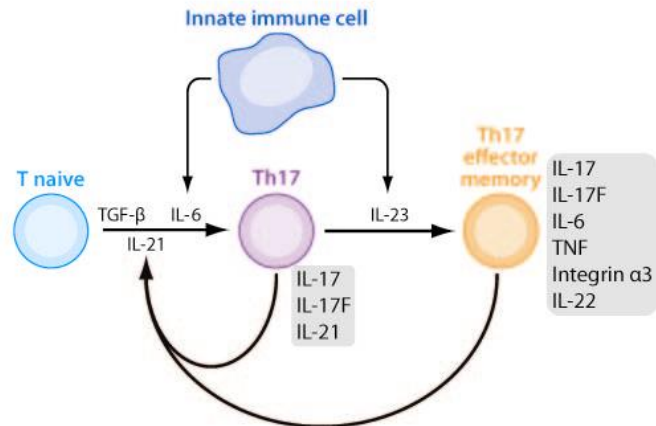
Al igual que sucede en la EM, la EAE se ha considerado tradicionalmente una enfermedad mediada por células Th1 y por las citocinas secretadas por estas: IFN- $\gamma$ , factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), linfoxina- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) e IL-2. El IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  activarían a los M $\phi$ s que tienen capacidad para destruir la mielina y secretar más citocinas como IL-12, IL-23 y TNF- $\alpha$ .

Durante mucho tiempo se pensaba que la patogenia de la EAE estaba mediada por un desajuste en el balance Th1/Th2, aunque debido a la posterior descripción de las células Th17, esta teoría está siendo reconsiderada. Las células Th17 son células T CD4<sup>+</sup> que secretan citocinas como IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-21 e IL-22 (Korn et al. 2009). La IL-17 es una citocina proinflamatoria que se ha implicado en la patogenia de diversas enfermedades autoinmunes y alérgicas (EM, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y asma bronquial, entre otras) (Fujino et al. 2003, Hirota et al. 2007, Kebir et al.

2007, Tzartos et al. 2008). Estimula la producción de otras citocinas proinflamatorias y está implicada en el reclutamiento de neutrófilos al foco de inflamación. En el proceso de diferenciación de células T inmaduras hacia células Th17 participan el TGF- $\beta$  y la IL-6 y, sólo en el caso en que los niveles de IL-6 no sean suficientes, la IL-21 sería importante en la diferenciación y mantenimiento de las células Th17. La IL-23 no estaría implicada en la diferenciación sino que se encargaría de la maduración de las células Th17 haciendo que produzcan IL-22 (Acha-Orbea et al. 1988) (Figura 18). La implicación de las células Th17 en el desarrollo de las enfermedades autoinmunes se ha visto confirmada en los estudios realizados en el modelo de EAE, donde se ha observado que la inhibición de la vía IL-17 impide el desarrollo de la enfermedad (Komiyama et al. 2006).

Además de la participación de las células Th1, Th2 y Th17, también se ha demostrado la participación de otros tipos celulares como las células T CD8<sup>+</sup> y las células B. En pacientes con EM se ha descrito que los linfocitos B producen anticuerpos contra antígenos de la mielina (anti-MBP y anti-MOG), cuya presencia se ha asociado a una mayor desmielinización (Genain et al. 1999), así como a una peor evolución de la enfermedad (Berger et al. 2003). Por parte de las células T CD8<sup>+</sup> existen evidencias de que juegan un papel relevante en la inmunopatogenia de la EM. Hay estudios en los que se han observado un mayor número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> que T CD4<sup>+</sup> en el infiltrado inflamatorio en el SNC (Kebir et al. 2009, Montes et al. 2009), también se ha descrito una correlación entre el daño axonal y el número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> presente en el infiltrado, y en estudios *in vitro* se ha descrito la participación de las células T CD8<sup>+</sup> de una forma directa en el daño axonal, atacando directamente a los axones neuronales (Hori et al. 2003, Tsaknaridis et al. 2003).

## Introducción



**Figura 18 – Esquema de la respuesta Th17.** Ver texto. Tomado de (Korn et al. 2009).

### **d. Histopatología**

Los diferentes modelos de EAE reproducen los hallazgos histopatológicos de la EM. En el SNC de los animales con EAE se observan infiltrados inflamatorios perivasculares y parenquimatosos constituidos principalmente por linfocitos y Mφs que han atravesado la barrera hematoencefálica (BHE) (Lassmann et al. 1980, Polman et al. 1986, Pender 1987). En función de la especie o cepa y del antígeno usado para la inducción de la enfermedad, las lesiones inflamatorias pueden ir acompañadas de áreas de desmielinización. El modelo agudo de EAE en rata Lewis inmunizada con MBP se caracteriza por la ausencia de estas áreas de desmielinización, en cambio estas sí que se observan en los modelos remitente-recurrente (ratones SJL inmunizados con PLP) y no remitente (C57BL/6 inmunizados con MOG), siendo más extensas en este último modelo.

En la EAE, al igual que en la enfermedad humana, también se observa daño y pérdida axonal (Raine et al. 1984, Raine and Cross 1989, Kornek et al. 2000) y se piensa que esta es la principal causa de la discapacidad permanente (Wujek et al. 2002). Además, se ha descrito que la formación de edema podría contribuir al proceso patológico (Simmons et al. 1982, Kerlero de Rosbo et al. 1985), aunque los fallos en la

conducción nerviosa debido a la desmielinización constituyen un importante factor patogénico de la enfermedad (Pender 1987).

### **6.2. Tratamiento de la EM**

En la actualidad no existe ningún tratamiento curativo para la EM, en parte debido a la complejidad de la enfermedad y al desconocimiento de su etiología. Los tratamientos actuales tienen como objetivo modular la respuesta inmune para así poder disminuir la frecuencia o intensidad de los brotes clínicos y retrasar la progresión de la enfermedad.

El primer tipo de tratamientos está dirigido a tratar el brote agudo, en el que predomina el componente inflamatorio. Con el fin de reducir la inflamación, los pacientes en brote son tratados con dosis elevadas corticoesteroides tales como la prednisona o metilprednisolona (Miller et al. 2000).

El segundo grupo de tratamientos son los tratamientos modificadores de la enfermedad, los cuales se subdividen a su vez en tratamientos de primera y de segunda línea. Dentro de los fármacos de primera línea encontramos el IFN- $\beta$  (IFN- $\beta$ -1a e IFN- $\beta$ -1b) y el acetato de glatirámico (AG), los cuales han demostrado reducir la frecuencia y gravedad de los brotes, la acumulación de lesiones por resonancia magnética (RM) y, en menor medida, la progresión de la discapacidad (Paty and Li 1993, Johnson et al. 1995). El IFN- $\beta$  ha demostrado tener múltiples efectos inmunomoduladores en las células T y estabilizar la BHE (Markowitz 2007). Por su parte, el AG es un copolímero sintético que ejerce efectos inmunomoduladores sobre las células T autoreactivas frente a MBP (Neuhaus et al. 2000, Yong 2002). Recientemente han sido aprobadas otras terapias para EM: la teriflunomida (inhibidor de la síntesis de pirimidinas), el dimetilfumarato, el cual ha conseguido disminuir los niveles de citocinas proinflamatorias (Wilms et al. 2010), ambos como terapias orales y ya están disponibles en España y forman parte de los tratamientos de primera línea.

## **Introducción**

Cuando los pacientes no responden frente a los tratamientos de primera línea o tienen una progresión muy agresiva, son tratados con los denominados tratamientos de segunda línea, los cuales son más efectivos, pero a su vez tienen importantes efectos adversos. En este grupo encontramos los tratamientos inmunosupresores como la mitoxantrona (Hartung et al. 2002), el natalizumab, el fingolimod y el alemtuzumab. El natalizumab es un anticuerpo monoclonal contra la cadena  $\alpha 4$  de la integrina VLA-4 (Very Late Antigen) de los linfocitos, previniendo su interacción con el VCAM-1 (molécula de adhesión vascular 1) de la BHE, evitando de este modo la extravasación de linfocitos activados hacia el SNC. Se ha demostrado que el natalizumab es muy efectivo reduciendo tanto el número de recaídas anuales como el número de lesiones por RM. No obstante, a consecuencia del tratamiento, los pacientes presentan un riesgo a desarrollar una leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML), una enfermedad generalmente letal causada por el virus JC (Rudick et al. 2013). El fingolimod fue el primer fármaco oral aprobado para la EM. Se trata de un análogo que se une al receptor 1-fosfato de la esfingosina impidiendo que los linfocitos salgan del ganglio linfático y que contribuyan a la respuesta autoinmunitaria (Aktas et al. 2010). Recientemente ha sido aprobado el alemtuzumab (anti-CD52) como terapia basada en la utilización de anticuerpos monoclonales, el cual ya está disponible en España formando parte de los tratamientos de segunda línea.

Actualmente hay otras estrategias terapéuticas nuevas están en fase de ensayo clínica, la mayoría basadas en la utilización de anticuerpos monoclonales, como el daclizumab (anti-CD25), ocrelizumab y ofatumumab (anti-CD20) y el fármaco oral laquinimod (Rommer et al. 2013).

### ***a. Terapias experimentales***

Debido a que algunos pacientes no responden a los tratamientos inmunomoduladores o inmunosupresores y a la falta de tratamientos para las formas PP,

se hace necesario buscar tratamientos más efectivos y específicos que mejoren los resultados actuales.

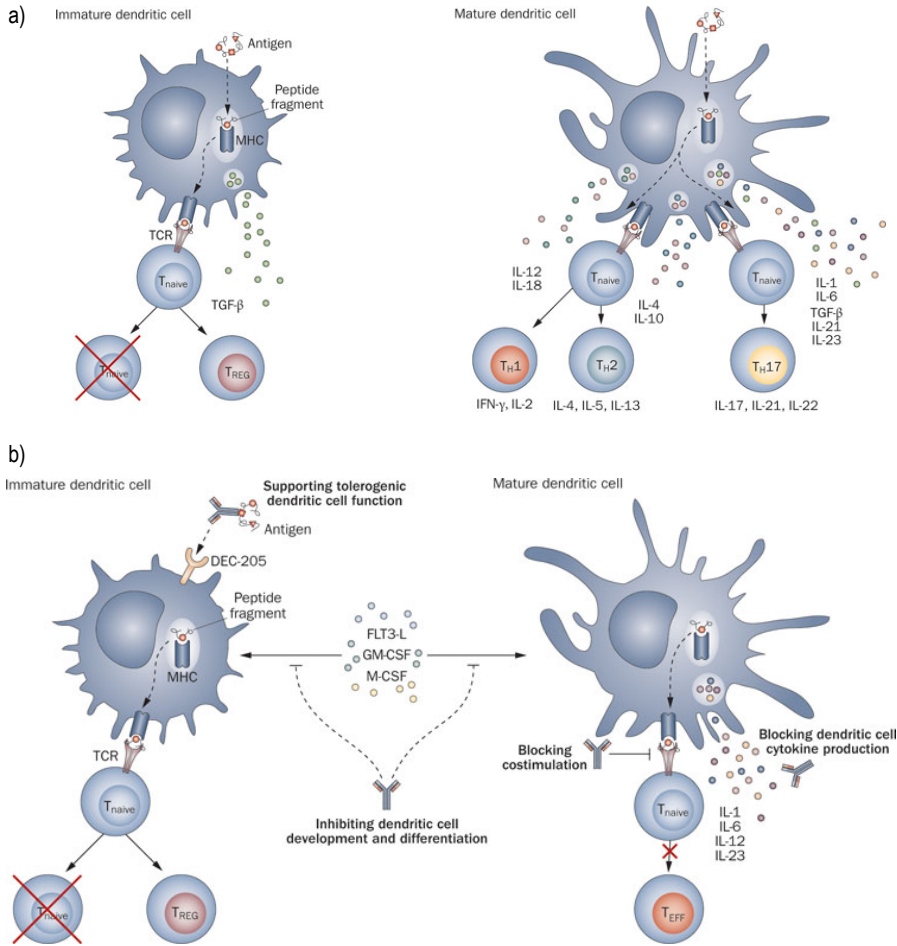
El trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TAPH) es otra de las aproximaciones terapéuticas que se están ensayando. La base racional para este tratamiento consiste en la eliminación de las células autoreactivas como consecuencia del régimen de acondicionamiento (mielo e inmunoblato) previo al trasplante y en la posterior reconstitución inmunitaria (lo que se denomina *reset* o reinicio del sistema inmune) a partir de las CMHs trasplantadas (Schippling et al. 2008), lo que provoca una renovación del repertorio de células T. Así, en pacientes que han recibido un TAPH se ha observado un aumento significativo de células T CD4<sup>+</sup> inmaduras y/o de células Treg (Muraro et al. 2005). Es difícil de evaluar la eficacia del TAPH como tratamiento debido al bajo número de pacientes incluidos en cada estudio, a las diferencias entre los protocolos de acondicionamiento y trasplante y a que la mayoría de los pacientes incluidos en los ensayos tenían una EM muy avanzada. Tal y como se ha observado en el modelo animal, durante la fase aguda, cuando mayoritariamente se dan los procesos inflamatorios, es cuando el trasplante de CMHs tiene mayores probabilidades de mejorar, e incluso revertir la enfermedad, mientras que si el trasplante se realiza en una etapa más avanzada, la eficacia del tratamiento se reduce debido a la acumulación de daño neuronal (Herrmann et al. 2005). Esto nos sugiere que para futuras indicaciones del TAPH y del resto de tratamiento inmunomoduladores se debería tener en cuenta el momento (o fase de la enfermedad) en que se realiza la terapia.

Existen otras aproximaciones terapéuticas que se basan en la inducción de tolerancia para revertir el estado de autoinmunidad. Estos tratamientos se pueden agrupar en: vacunas de células T autoreactivas atenuadas (TCV) y vacunas que interfieren en la presentación antigénica y la activación de linfocitos autoreactivos [como por ejemplo, administración de ligandos peptídicos alterados (APL)] (Correale et al. 2008). Cada una de ellas induce uno o varios mecanismos de tolerancia, en el caso del APL el péptido modificado compite con el autoantígeno para unirse a las moléculas de

## **Introducción**

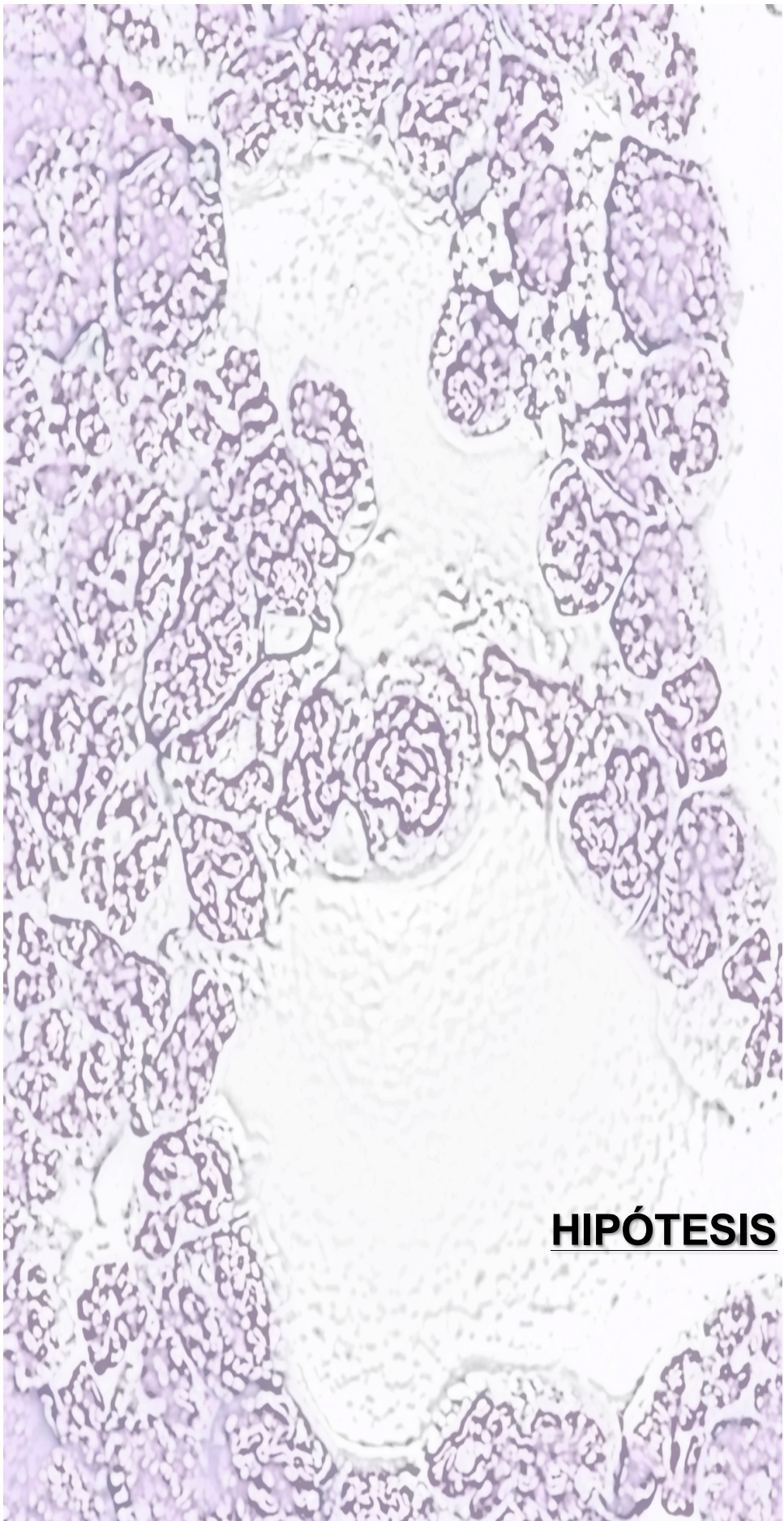
MHC-II, interfiere en la unión MHC-II con la célula T autoreactiva, lo que provoca anergia en las células T autoreactivas y, por lo tanto, la ausencia de respuesta de las células T frente a los autoantígenos. Utilizando esta estrategia se ha conseguido prevenir la EAE remitente-recurrente (Nicholson et al. 1995).

Finalmente, existen otros abordajes terapéuticos basados también en la inducción de tolerancia que tienen como diana las DCs (Figura 19). Las DCs son las células APC "profesionales" y tienen la capacidad de modular la respuesta inmune adaptativa. Tal y como se ha explicado anteriormente, las DCs procesan los antígenos que hay en el organismo y presentan fragmentos peptídicos de estos mediante las moléculas MHC. Este hecho, junto con la expresión de moléculas de coestimulación en su superficie celular y la secreción de diversas citocinas provoca la activación de las células T iniciando así la respuesta inmune frente a los antígenos presentados por las DCs. La mayoría de estrategias terapéuticas que tienen a las DCs como diana utilizan anticuerpos monoclonales dirigidos contra las citocinas secretadas por las DCs o contra las moléculas de coestimulación que expresan en su superficie, evitando así la activación de los linfocitos T. Aparte de evitar la activación de los linfocitos T por parte de las DCs, también se han realizado estudios dirigidos a evitar la maduración de las DCs ya que las iDCs tienen la capacidad de inducir tolerancia gracias a los bajos niveles de expresión de moléculas de coestimulación y a su patrón de expresión de citocinas. Estudios realizados en el modelo animal de la EAE utilizando DCs tolerogénicas (tolDC) generadas mediante la utilización de vitamina D3 ha mostrado un efecto terapéutico beneficioso (Mansilla et al. 2015). Actualmente se ha iniciado un ensayo clínico con tolDC generadas utilizando dexametasona en pacientes con EM.



**Figura 19 - Estrategias terapéuticas con las DCs como diana.** a) estadios de maduración de las DCs y su función en la maduración de las células T. b) Diferentes aproximaciones terapéuticas que tienen como objetivo evitar la maduración de las DCs o la activación de las células T. Figura obtenida de Comabella, M. et al. Nat Rev Neurol 2010.





**HIPÓTESIS**



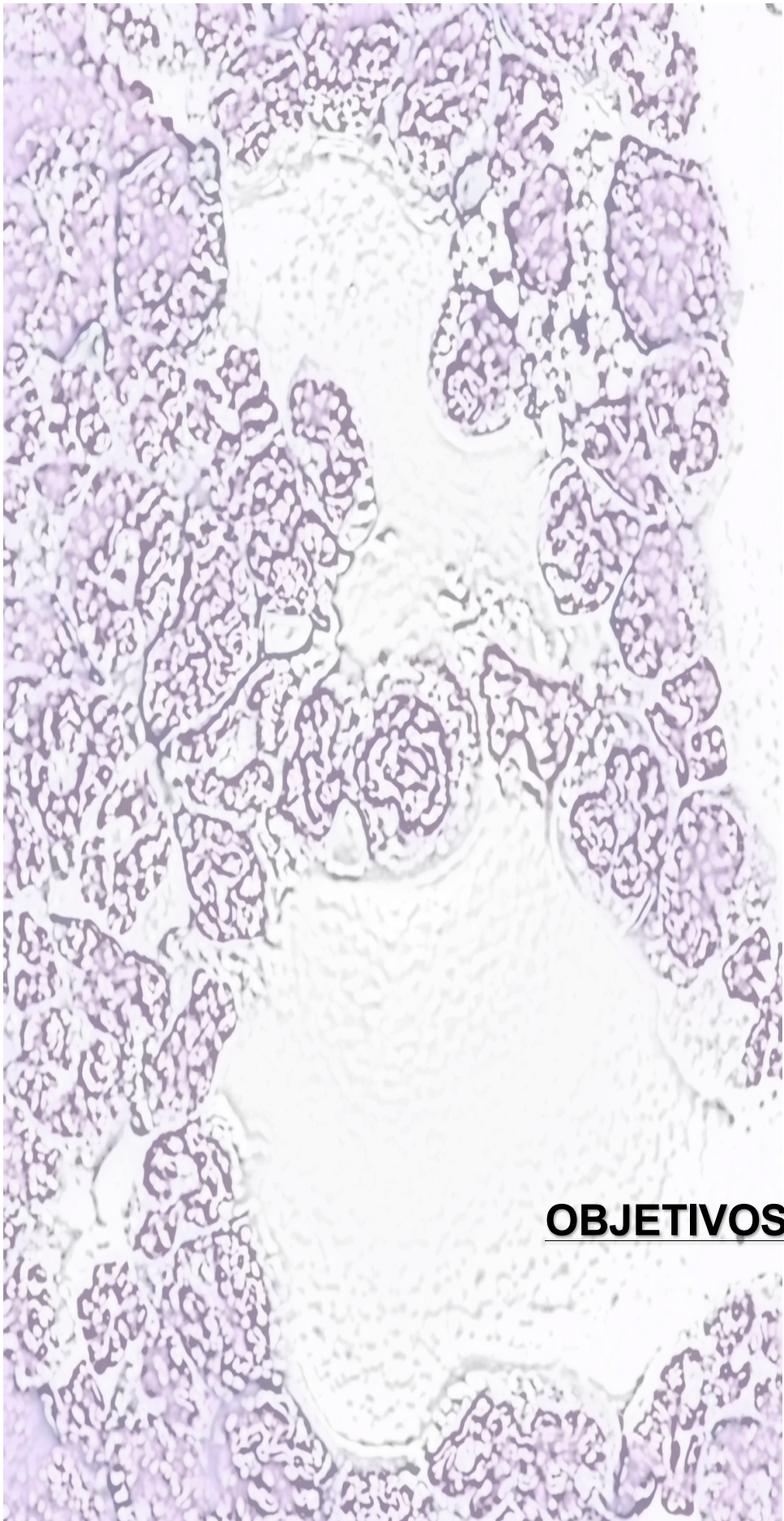
## Hipótesis

La terapia génica se puede utilizar para inducir tolerancia inmunológica experimentalmente. Nuestro trabajo anterior mostró que la transferencia de células de MO que habían sido transducidas con un autoantígeno (MOG<sub>40-55</sub>) en ratones con EAE mejoró la enfermedad. El efecto era antígeno-específico y se observó tanto en los animales que habían recibido una mieloablación parcial como en los animales que no habían recibido tratamiento mieloablativo. Curiosamente, el efecto se observó muy poco después de la infusión de células de MO y era independientemente del injerto de las células transducidas. En estos experimentos, las células transducidas con el autoantígeno eran rechazadas debido a la sensibilización previa al péptido utilizado para inducir la enfermedad.

Estos datos nos hicieron plantear la hipótesis de que la **inducción de tolerancia observada en el modelo animal de EM se debe a mecanismos de tolerancia periférica y que está mediada por una o varias poblaciones celulares que se transducen y están presentes o se generan en los cultivos de MO.**

Por ello consideramos relevante caracterizar el fenotipo de las células de MO transducida y estudiar la capacidad de inducción de tolerancia de las poblaciones candidatas a mediar el efecto tolerogénico observado.





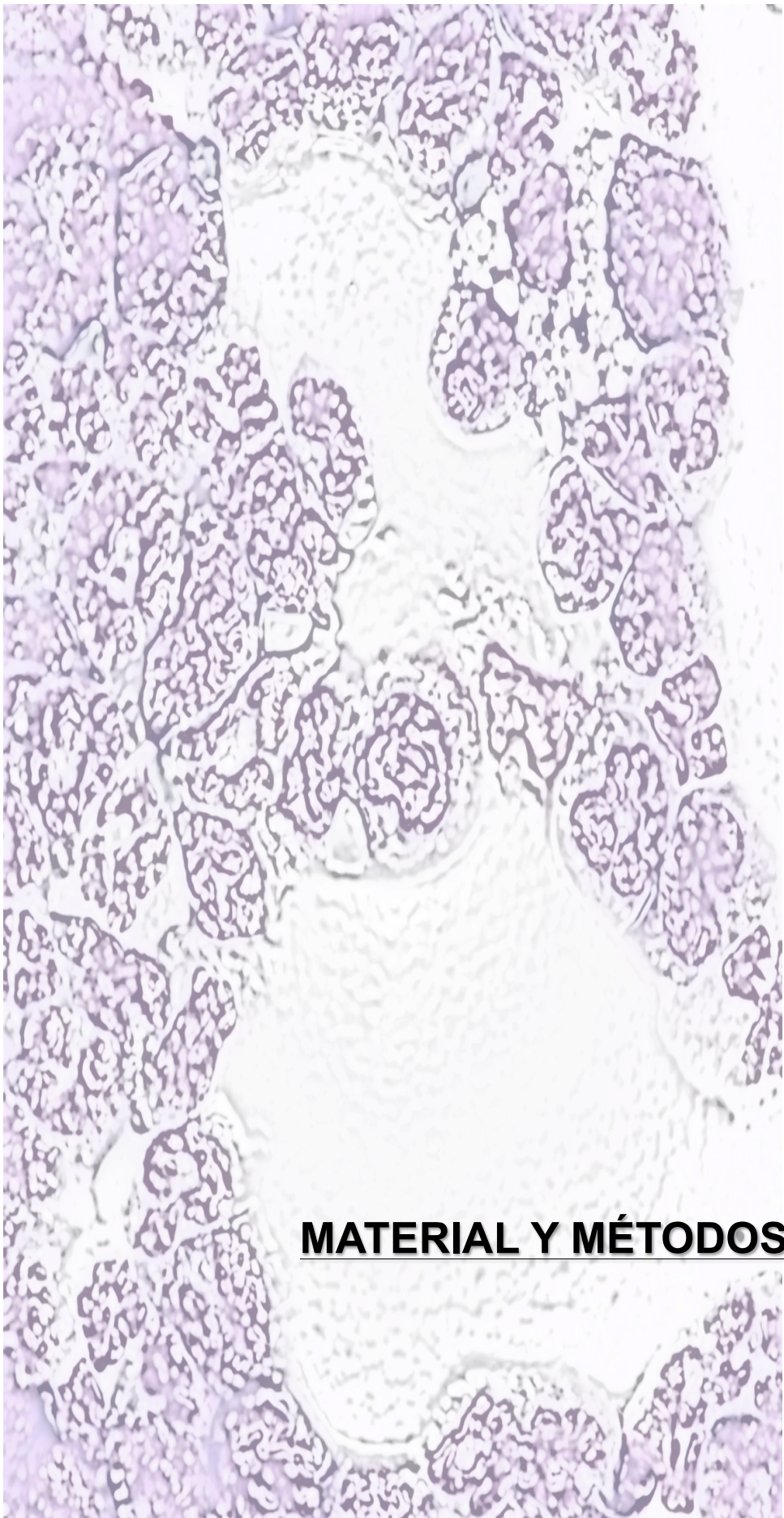
**OBJETIVOS**



## **Objetivos**

1. Caracterizar fenotípica y funcionalmente las distintas poblaciones celulares que se generan en los protocolos de transducción de células de MO murina.
2. Identificar las poblaciones celulares derivadas de la MO candidatas a inducir tolerancia inmunológica en el modelo de EAE.
3. Estudiar los mecanismos de acción implicados en la inducción de tolerancia inmunológica por parte de las poblaciones celulares candidatas.
4. Determinar si las poblaciones candidatas median tolerancia inmunológica *in vivo*, en el modelo de EAE.
5. Estudiar la participación de las células Treg en la inducción de tolerancia inmunológica en el modelo de EAE.



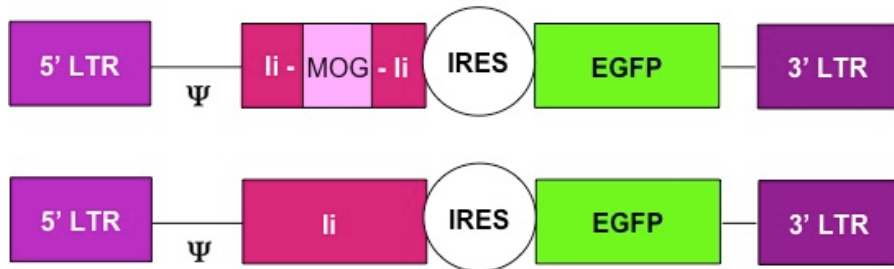


**MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. VECTORES RETROVIRALES

Los vectores retrovirales empleados en este trabajo habían sido generados anteriormente en nuestro laboratorio (Eixarch et al. 2009) a partir del vector retroviral SF91-IRES-EGFP (cedido por C. Baum, Hannover, Alemania) (Hildinger et al. 1999), y basado en el virus MoMLV. Esta familia de vectores retrovirales está optimizada para una expresión elevada de transgenes en progenitores hematopoyéticos mieloides. Los dos vectores retrovirales utilizados contenían la secuencia codificante para la li murina salvaje (SF91-li-IRES-EGFP, vector control) o la li murina con la secuencia que codifica para la región CLIP sustituida por la que codifica para el péptido MOG<sub>40-55</sub> de rata (SF91-liMOG-IRES-EGFP). Esta estrategia se utiliza para obtener una buena presentación del autoantígeno por la vía del MHC-II (Carstens et al. 2000). Además, se utilizó la EGFP como gen marcador.



**Figura 20 - Esquema de los vectores retrovirales usados.** El vector superior corresponde a SF91-liMOG-IRES-EGFP y expresa la li murina con el autoantígeno MOG<sub>40-55</sub> reemplazando la región CLIP, además de la EGFP. En la parte inferior se observa el vector SF91-li-IRES-EGFP que se usó como control.

CLIP: péptido asociado a la cadena invariante de las MHC-II; LTR: secuencias repetitivas largas de los extremos; IRES: sitio interno de entrada del ribosoma; li: cadena invariante; MOG: glicoproteína mielínica de los oligodendrocitos; EGFP: proteína fluorescente verde mejorada

## **Material y Métodos**

### **2. LÍNEAS CELULARES PRODUCTORAS DE VECTORES RETROVIRALES**

En este trabajo se utilizaron dos líneas productoras ecotrópicas derivadas de la línea empaquetadora NX-e (a su vez derivada de la línea celular HEK-293 de riñón embrionario humano) denominadas NX-e/li7 y NX-e/liMOG23. Ambas líneas celulares expresan de forma estable tres elementos. El primero codifica para la glicoproteína ecotrópica de la envuelta del retrovirus (*env*), con tropismo para células murinas, el segundo codifica tanto para el resto de proteínas estructurales del virus para formar nuevos viriones (*gag*) como para las enzimas necesarias para el ciclo vital del virus (*pol*) y el tercero es el vector retroviral que contiene el o los transgenes y las secuencias reguladoras de su expresión. La línea NX-e/li7 contiene el vector retroviral SF91-li-IRES-EGFP y la NX-e/liMOG23 el vector retroviral SF91-liMOG-IRES-EGFP. Ambas fueron generadas en nuestro laboratorio y producen sobrenadantes con títulos virales de  $0.8 \times 10^6$  y  $2 \times 10^6$  partículas infecciosas (PI) / ml, respectivamente (Eixarch et al. 2009).

Las líneas celulares se mantuvieron en cultivo, a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 100% de humedad relativa, en medio DMEM (PAA, Linz, Austria) suplementado con:

- 10% de FCS Gold (PAA)
- 2 mM de L-glutamina (PAA)
- 50 UI/ml de penicilina (PAA)
- 50 µg/ml de estreptomycin (PAA)

### **3. TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS**

#### **3.1. Ratones**

Para la obtención de células de MO se utilizaron ratones hembras de entre 6 y 10 semanas de edad de la cepa B6/SJL-*PtprcaPep3b/BoyJ* (*Jackson Laboratory*, Sacramento, CA, EEUU; en adelante nos referiremos a esta cepa como B6/SJL), criada y mantenida en el estabulario del VHIR. Se estabularon en salas con temperatura controlada (20-22° C) y con ciclos de luz-oscuridad de 12 h. Los animales se

mantuvieron y manipularon según la normativa nacional y europea y con la aprobación del *Comitè Ètic d'Experimentació Animal (CEEA) del VHIR*.

Como ratones receptores se utilizaron hembras de entre 6 y 10 semanas de edad de la cepa C57BL/6J (Harlan Laboratories, Lesmo MB, Italia). A su llegada, se distribuyeron en grupos de 5 ó 10 ratones por jaula en *racks* ventilados y permanecieron en cuarentena durante un período mínimo de una semana. Las dos cepas son congénicas, es decir, comparten idéntico MHC (H-2<sup>b</sup>) 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 hematopoyético las células del donante pueden diferenciarse de las del receptor mediante un simple marcaje con anticuerpos monoclonales específicos para una u otra variante alélica.

### **3.2. Obtención de células de la médula ósea**

A los ratones donantes se les administró una dosis de 100 mg/kg de 5-fluorouracilo (5-FU; Ferrer Farma, Barcelona, España) en suero fisiológico por vía intraperitoneal (i.p.). Este tratamiento elimina las células que están en división, enriquece en progenitores hematopoyéticos inmaduros (más quiescentes) y a su vez los induce a dividirse, condición indispensable para poder ser transducidos con vectores retrovirales.

A los cinco días de la administración del 5-FU, los ratones se sacrificaron mediante asfixia por CO<sub>2</sub>. 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 (NUNC, Roskilde, Dinamarca) conteniendo 10 ml de medio IMDM (PAA) suplementado con:

## **Material y Métodos**

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

Trabajando en cabina de flujo laminar vertical, los huesos desprovistos de tejidos adyacentes se colocaron en un mortero estéril con 6 ml de medio IMDM suplementado y se machacaron con suavidad 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 (BD, San Jose, CA, EEUU). Después de varios lavados con medio IMDM para recoger las células liberadas del hueso, se centrifugaron 5' a 453 g y se procedió a su contaje en una cámara de Neubauer usando solución de Türk (Merk-Millipore, Darmstadt, Alemania) 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 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MI, EEUU) (0,4% azul de tripano en suero fisiológico) y contando el número de células vivas (que no incorporan el colorante) y muertas (que sí lo incorporan).

### **3.3. Transducción de las células de la MO**

#### ***a. 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 (NUNC) estas se incubaron con 1 ml de solución de RetroNectin® (fragmento recombinante CH-296 de la fibronectina (Takara Shuzo, Co., LTD, Kyoto, Japón) diluido en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de 48 µg/ml) durante 2 h a temperatura ambiente. Una vez retirada la solución que contenía el CH-296, las placas se incubaron durante 30' a temperatura ambiente con PBS y albúmina sérica bovina (BSA; Sigma Aldrich) al 2%. Finalmente, se lavaron con 1 ml de solución salina tamponada de Hank (HBSS, PAA) que contenía 25 mM de tampón Hepes (PAA).

### ***b. Preestimulación de las células de la MO con citocinas***

Las células de la 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  $\mu$ g/ml de estreptomina
- 10% de medio condicionado de la línea celular WEHI-3B, como fuente de IL-3 murina (Lee et al. 1982).
- 8% de medio condicionado de la línea celular BHK/MKL (*baby hamster kidney / murine kit ligand*), como fuente de factor de crecimiento de células madre murino (mSCF) y cedida por S. Tsai (*Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, EEUU*).

\* De forma alternativa se utilizaron citocinas murinas recombinantes: mSCF, mIL3, mTPO, mFlt3 (Immunotools, Friesoythe, Alemania), todas a una concentración de 10 ng/ml.

La preestimulación con citocinas se llevó a cabo durante 48 h en un incubador a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 100% de humedad relativa con la finalidad de estimular a las células progenitoras a dividirse y prevenir su apoptosis.

### ***c. Obtención del sobrenadante rico en vectores recombinantes***

Las líneas productoras de retrovirus recombinantes NX-e/Il7 y NX-e/IlMOG23 se descongelaron siguiendo las técnicas estándares de descongelación. Se cultivaron en medio DMEM suplementado y se mantuvieron en cultivo, como se especifica en el apartado 2 de esta misma sección. Cuando llegaron a confluencia, se subcultivaron en un frasco de cultivo de volumen adecuado para poder obtener el volumen de

## **Material y Métodos**

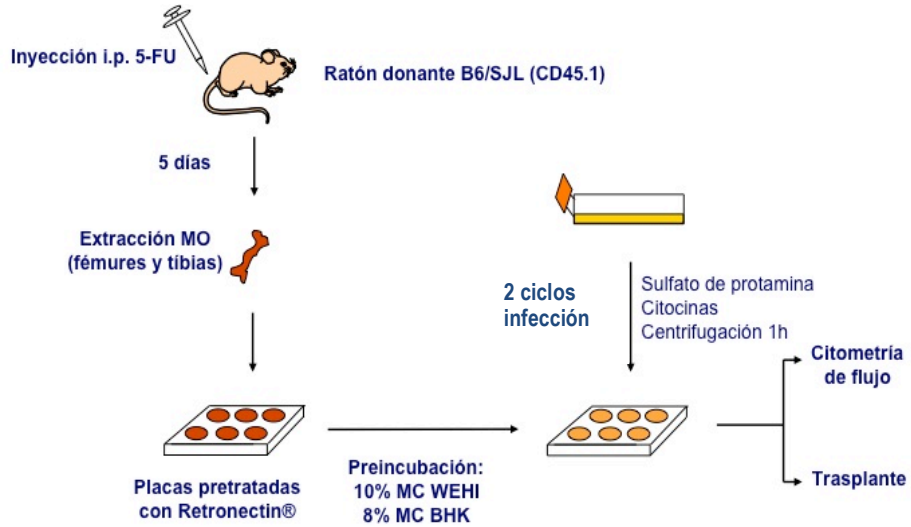
sobrenadante necesario para la transducción. El día previo a la recogida del sobrenadante rico en vectores se cambió el medio habitual de crecimiento de las líneas productoras de vectores por el medio adecuado para el cultivo de las células diana a transducir (ver apartado 2.3.2, pero sin añadir los medios condicionados de las líneas celulares WEHI-3B y BHK/MKL). A las 16-18 h se recogió el sobrenadante y se filtró (0,45  $\mu\text{m}$ ) para evitar el posible paso de células productoras de vectores. Los sobrenadantes se usaron inmediatamente o se alicuotaron y criopreservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta que hubo necesidad de utilizarlos.

### ***d. Transducción de las células de la médula ósea con vectores retrovirales***

Se realizaron dos ciclos de transducción en dos días consecutivos usando una multiplicidad de infección (MOI) aproximada de entre 1 y 2 en cada ciclo (Figura 21). Se recogió el 90% del volumen de medio de cada pocillo en un tubo de 50 ml y se centrifugó 5' a 453 g a  $4^{\circ}\text{C}$ . El *pellet* celular se resuspendió en la siguiente mezcla:

- 10% de medio condicionado WEHI-3B
- 8% de medio condicionado BHK/MKL
- 4  $\mu\text{g/ml}$  de sulfato de protamina
- 82% de sobrenadante de la línea productora de retrovirus

En cada pocillo se restauró el volumen con medio rico en vectores en el que se resuspendieron las células que se habían recogido. Las placas se centrifugaron a 652 g durante 1 h a  $32^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente se repitió este mismo procedimiento.



**Figura 21 - Esquema de la obtención y transducción de la MO murina.** Ver texto.  
5-FU: 5-fluorouracilo; MC: medio condicionado.

### 3.4. Recuperación de las células de MO cultivadas

Transcurridas 24 h desde el segundo ciclo de transducción, las células en cultivo se despegaron del plástico usando *Cell Dissociation Buffer Enzyme-free PBS-based* (Gibco BRL, Paisley, Reino Unido) y se recogieron en un tubo de 50 ml. Después de lavarlas con PBS, se contaron en una cámara de Neubauer diluyéndolas en solución de Türk y se evaluó la viabilidad con azul de tripano como ya se ha descrito anteriormente. A continuación fueron incubadas en 10 UI de DNasa (Sigma Aldrich) por cada  $10^6$  CMN durante 15' a 25°C. Después de lavarlas se resuspendieron en el volumen adecuado de PBS para finalmente realizar los ensayos funcionales que se describen a continuación, separación celular o inyectarlas i.v. por la vena lateral de la cola (ver apartado 10).

## 4. ANÁLISIS FENOTÍPICO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

La caracterización fenotípica de las células hematopoyéticas transducidas y de las diferentes poblaciones estudiadas se realizó mediante citometría de flujo multicolor

## **Material y Métodos**

usando hasta cinco fluorocromos distintos en el mismo panel de anticuerpos, analizados en un citómetro de flujo FACS Canto™ (BD).

### **4.1. Eficiencia de transducción**

Antes del trasplante, 24 h después del segundo ciclo de transducción, se separaron  $10^5$  CMN del cultivo para evaluar la eficiencia de transducción mediante el análisis de la expresión del gen marcador EGFP por citometría de flujo. El análisis se hizo descartando las células muertas mediante marcaje con el marcador de viabilidad 7-aminoactinomicina D (7-AAD; Molecular Probes, Eugene, OR, EEUU) a  $1 \mu\text{g/ml}$ . Este colorante es capaz de atravesar las membranas celulares si no están intactas e intercalarse en el ADN, de forma que solamente se tiñen las células apoptóticas o muertas, pudiéndolas excluir del análisis y evitando así la interferencia de la autofluorescencia que estas emiten.

### **4.2. Análisis fenotípico de las células hematopoyéticas**

Dependiendo del marcador o marcadores celulares a analizar se siguió uno de los protocolos descritos a continuación:

#### ***a. Marcaje de superficie directo***

1. Lavar las células [ $0,5 \times 10^6$  CMN de los tejidos hematopoyéticos o  $50 \mu\text{l}$  de sangre periférica (SP)] con 1 ml de PBS + BSA al 1% + azida sódica 0,1% (PBA-azida).
2. Bloqueo de los receptores Fc: añadir un 10% de suero de ratón o bien  $1 \mu\text{l}$  del anticuerpo de rata anti-CD16/CD32 de ratón (BD Pharmingen San Diego, CA, EEUU) e incubar 10' a temperatura ambiente.
3. Añadir los anticuerpos específicos y/o los controles de isotipo conjugados con fluorocromos e incubar 30' a  $4^\circ\text{C}$  en la oscuridad.
4. Lavar con 1 ml de PBA-azida.

## **Material y Métodos**

5. Lisar los eritrocitos con la solución de lisis *Pharm Lyse solution* (BD Pharmingen) durante 10' a 37°C.
6. Lavar con 1 ml de PBA-azida.
7. Resuspender en 300-400 µl de PBA-azida.
8. Analizar en el citómetro de flujo.

### ***b. Marcaje de superficie indirecto***

1. Lavar las células ( $0,5 \times 10^6$  CMN de los tejidos hematopoyéticos o 50 µl de SP) con 1 ml de PBA-azida.
2. Bloqueo de los receptores Fc: añadir un 10% de suero de ratón o bien 1 µl del anticuerpo de rata anti-CD16/CD32 de ratón e incubar 10' a temperatura ambiente.
3. Añadir los anticuerpos específicos y los controles de isotipo conjugados con biotina, e incubar 30' a 4°C.
4. Lavar con 1 ml de PBA-azida.
5. Añadir la estreptavidina conjugada con un fluorocromo e incubar 30' a 4°C en la oscuridad.
6. Lavar con 1 ml de PBA-azida.
7. Lisar los eritrocitos con la solución de lisis *Pharm Lyse solution* durante 10' a 37°C.
8. Lavar con 1 ml de PBA-azida.
9. Resuspender en 300-400 µl de PBA-azida.
10. Analizar en el citómetro de flujo.

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

## Material y Métodos

**Tabla 5: Marcaje de linaje hematopoyético y población eritroide**

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	µg / 10 <sup>6</sup> céls	Fabricante
CD3	APhC	IgG1 de hámster	145-2C11	0,2	BD Pharmingen
CD4	APhC	IgG2a de rata	RM4-5	0,2	Caltag, Buckingham, Reino Unido
CD8	APhC	IgG2a de rata	53-6.7	0,56	Biolegend, San Diego, CA, EEUU
CD11b	APhC	IgG2b de rata	M1/70	0,2	Biolegend
CD19	APhC	IgG2a de rata	6D5	0,05	Biolegend
Gr-1	APhC	IgG2b de rata	RB6-8C5	0,2	BD Pharmingen
Ter119	Pe/Cy5	IgG2b de rata	TER-119	0,2	BD Pharmingen
CD45.1	APhC/Cy7	IgG2a de ratón	A20	0,2	Biolegend

**Tabla 6: Marcaje de células T y NK**

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	µg / 10 <sup>6</sup> céls	Fabricante
CD3	PE	IgG2a de rata	CT-CD3	0,2	Caltag
CD4	Biotina	IgG2a de rata	RM4-5	0,2	Caltag
CD8	APhC	IgG2a de rata	53-6.7	0,56	Biolegend
NK1.1	PE/Cy7	IgG2a de ratón	PK135	0,4	eBioscience, San Diego, CA, EEUU
Estreptavidina	PerCP	-	-	0,2	BD Pharmingen

**Tabla 7: Marcaje de células B**

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	µg / 10 <sup>6</sup> céls	Fabricante
CD19	APhC	IgG2a de rata	6D5	0,02	Biolegend
B-220	Biotina	IgG2a de rata	RA3-6B1	0,13	eBioscience
Estreptavidina	PerCP	-	-	0,13	BD Pharmingen

**Tabla 8: Marcaje de poblaciones mieloides**

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	$\mu\text{g} / 10^6$ céls	Fabricante
CD11b	APhC	IgG2b de rata	M1/70	0,2	Biolegend
CD11c	PerCP	IgG1 de hamster	N418	0,1	Biolegend
CD40	PE	IgG2a de rata	3/23	0,4	BD Pharmingen
CD80	PE	IgG2 de rata	16-12A1	0,4	BD Pharmingen
CD86	PE	IgG2a de rata	GL1	0,4	BD Pharmingen
Gr-1	PE/Cy7	IgG2b de rata	RB6-8C5	0,4	Biolegend
I-A <sup>b</sup>	PE	IgG2a de ratón	AF6-120.1	0,4	Biolegend

#### 4.3. Análisis fenotípico de la población de MDSCs

Para el estudio fenotípico de las MDSCs se realizaron marcajes directos e indirectos de células de la MO con los siguientes anticuerpos:

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	$\mu\text{g} / 10^6$ céls	Fabricante
CD11b	APhC	IgG2b de rata	M1/70	0,2	Biolegend
CD124	PE	IgG2a de rata	mILR-M1	0,2	BD Pharmingen
Gr-1	PE/Cy7	IgG2b de rata	RB6-8C5	0,4	Biolegend
F4/80	PerCP	IgG2a de rata	BM8	0,4	Biolegend
CD14	PE	rat IgG <sub>1</sub> , k	rmC5-3	0,2	BD Pharmingen

#### 4.4. Análisis fenotípico de la población de MSCs

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

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	$\mu\text{g} / 10^6$ céls	Fabricante
CD29	FITC	IgMk de hamster	Ha2/5	0,2	BD Pharmingen
CD44	Biotina	IgG2b de rata	IM7	0,4	Biolegend
CD45	APhC /Cy7	IgG2a de ratón	A20	0,4	Biolegend
CD90.2	PE	IgG2a de ratón	53-2.1	0,2	BD Pharmingen
CD105	PE	IgG2a de rata	MJ7/18	0,56	Biolegend
I-A <sup>b</sup>	PE	IgG2a de ratón	AF6-120.1	0,4	Biolegend
H-2K <sup>b</sup>	PE	IgG2a de rata	36-7-5	0,4	BD Pharmingen

## **Material y Métodos**

### **5. TINCIÓN CELULAR DE MAY-GRÜNWARD GIEMSA**

Las MDSCs (CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup>; Cd11b<sup>+</sup> Gr1<sup>low</sup>) se separaron mediante citometría de flujo usando un separador células MoFlo (Beckman Coulter, Brea, California, EEUU) del resto de células de la MO transducida.

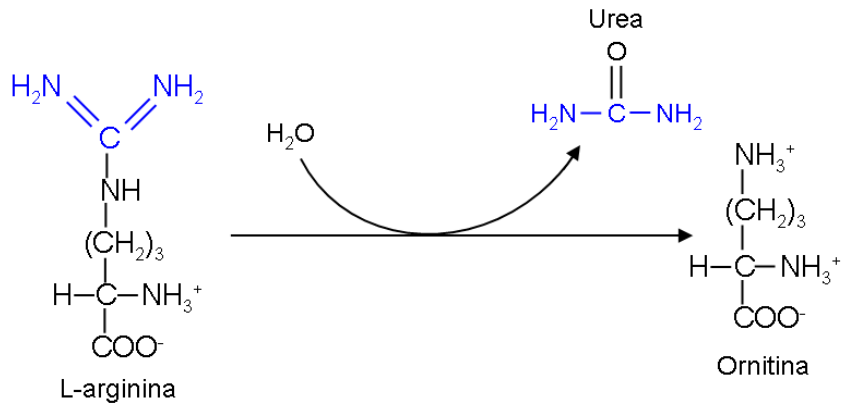
De cada subpoblación purificada se utilizaron 200 µl de una suspensión de células (0.5 x10<sup>6</sup> células/mL) que se centrifugaron en un citoespín directamente sobre un porta durante 5 min. a 800 rpm. Después de dejar secar al aire los portaobjetos, estos fueran teñidos en una solución de May-Grünwald (Sigma Aldrich,) durante 5'. Después de lavarlo con agua los portaobjetos fueron sumergidos en una solución de Giemsa (Sigma Aldrich) durante 15' y se dejaron secar a temperatura ambiente para poder posteriormente visualizarlos en un microscopio convencional (Olympus, Tokio, Japón)

### **6. ANÁLISIS BIOQUÍMICOS**

Para los diferentes análisis bioquímicos realizados se utilizaron células de MO transducidas, las poblaciones de MDSCs (CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup> Cd11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low</sup>) y la población de MSCs, estas últimas obtenidas mediante separación celular por citometría de flujo usando el separador celular MoFlo.

#### **6.1. Determinación de la actividad arginasa**

La actividad arginasa se cuantificó mediante un método colorimétrico que detecta la urea formada por la reacción catalizada por la arginasa-1 sobre el substrato L-arginina. (Figura 22) (Corraliza et al. 1994).



**Figura 22 - Reacción enzimática catalizada por la arginasa-1**

Para analizar la actividad arginasa-1, las células transducidas de la MO, las poblaciones MDSCs y la población de MSCs se cultivaron, por separado, a una densidad de 10<sup>6</sup> CMNs por ml en placas de 24 pocillos en medio MEM- $\alpha$  sin rojo de fenol (Gibco) suplementado con:

- 10% FCS Gold
- 2 mM de L-glutamina
- 50 UI/ml de penicilina
- 100 UI/ml de IFN- $\gamma$
- 100 ng/ml de lipopolisacárido (LPS, Sigma CO)

Las células se mantuvieron en cultivo durante 24 h en un incubador a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 100% de humedad relativa.

Como control negativo se utilizó las mismas células cultivadas en ausencia de IFN- $\gamma$  y LPS y como control positivo se utilizó la línea celular WEHI-3B (que en experimentos previos había demostrado poseer actividad arginasa-1, datos no mostrados) cultivada en el mismo medio de cultivo sin IFN- $\gamma$  ni LPS.

Pasado este tiempo se analizó la actividad arginasa-1 en estas células de la siguiente manera:

## **Material y Métodos**

1. Retirar el medio de cultivo, añadir 75  $\mu\text{l}$  de una solución de TritónX-100 al 0,1% en  $\text{H}_2\text{O}$  y agitar mediante un agitador de placas durante 30' a temperatura ambiente.
2. Añadir 75  $\mu\text{l}$  de Tris-HCl 25mM pH 7,4 y lisar las células con la ayuda de una micropipeta.
3. Pasar 50  $\mu\text{l}$  del lisado a un tubo Eppendorf, añadir 5  $\mu\text{l}$  de cloruro de manganeso ( $\text{MnCl}_2$ , Sigma CO) (coenzima de la arginasa-1) e incubar 10' a 55°C para activar las enzimas.
4. Una vez activada la arginasa-1, añadir 25  $\mu\text{l}$  de L-arginina 0,5 M pH 9,5 (Sigma CO) e incubar a 37°C durante 2 h.
5. Parar la reacción añadiendo 240  $\mu\text{l}$  de una solución ácida [ $\text{H}_2\text{O}$ :  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85%):  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (96%) (7:3:1)] (Sigma CO).
6. Por último, para cuantificar colorimétricamente la formación de urea se añaden 10  $\mu\text{l}$  de una solución de  $\alpha$ -isonitrosopropiofenona ( $\alpha$ -ISPF) (Sigma Aldrich) al 6% en etanol absoluto, que hace que la urea precipite, y se calienta durante 30' a 95-100°C para disolver los precipitados, obteniendo una solución de color rosa-violeta, dependiendo de la concentración de urea.
7. Ponemos 100  $\mu\text{l}$  de cada muestra en una placa de 96 pocillos y se mide la absorbancia óptica a 550 nm usando el equipo Triturus® (Grifols, Barcelona, España)

En cada experimento se realizó de forma paralela una curva patrón utilizando concentraciones crecientes de urea (de 0,01 mg/ml hasta 7,5 mg/ml) diluida en la solución Tris-HCl 25 mM. A 50  $\mu\text{l}$  de cada punto de la curva se añadieron 240  $\mu\text{l}$  de la solución ácida y 25  $\mu\text{l}$  de  $\alpha$ -ISPF y se prosiguió desde el punto 7.

La actividad enzimática se expresó en miliunidades (mU) teniendo en cuenta que 1 U de arginasa-1 es la actividad de enzima que produce 1  $\mu\text{mol}$  de urea por minuto a 37°C y por millón de células.

### **6.2. Cuantificación de nitritos**

El NO, producto de la reacción de la enzima iNOS, se cuantifica en forma de nitritos, según la reacción de Griess (*Ding et al. 1988*).

Para analizar la cantidad de nitritos producidos en nuestros cultivos de MO o por las poblaciones MDSCs o MSCs, se utilizó el kit colorimétrico *Nitrite/Nitrate Assay Kit* (Sigma Aldrich).

Se cultivaron las células como se ha explicado en el apartado 6.1, pasadas las 24 h se recogió el sobrenadante y se prosiguió siguiendo el protocolo recomendado por el kit:

1. Centrifugar el sobrenadante a 1000 g durante 15'.
2. Añadir 80  $\mu$ l de medio de cultivo y 20  $\mu$ l de *Buffer Solution* a cada pocillo de la placa de 96 pocillos.
3. Añadir 50  $\mu$ l de *Griess Reagent A* a cada pocillo.
4. Añadir 50  $\mu$ l de *Griess Reagent B*, mezclar bien con la ayuda de la micropipeta e incubar 10' a temperatura ambiente.
5. Medir la absorbancia óptica a 550 nm usando el equipo Triturus®

Para determinar la concentración de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> se utilizaron diferentes concentraciones de NaNO<sub>2</sub> siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **7. INDUCCIÓN DEL MODELO NO REMITENTE DE EAE Y SEGUIMIENTO CLÍNICO**

Se inmunizaron ratones hembra de entre 6 y 10 semanas de edad de la cepa C57BL/6J (Harlan Laboratories), previa anestesia con 37 mg/kg de ketamina (Ketolar, Pfizer, Estambul, Turquía) y 5,5 mg/kg de xilacina (Rompun, Bayer, España), mediante una inyección s.c. de una solución que contenía 100  $\mu$ g de péptido MOG<sub>40-55</sub> (sintetizado por la Sección de Proteómica, *Serveis Científicotècnics, Universitat Pompeu Fabra*) diluido en suero salino y emulsionado con adyuvante incompleto de Freund (Sigma Aldrich) conteniendo 4 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco Laboratorios, Sparks, MD, EEUU). Cada ratón recibió 50  $\mu$ l de la emulsión en cuatro puntos próximos

## **Material y Métodos**

a los ganglios linfáticos inguinales y axilares. El mismo día de la inmunización y a las 48 h se les administró 250 ng de toxina pertussis (Sigma Aldrich) en un volumen final de 200  $\mu$ l 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

## **8. OBTENCIÓN DE TEJIDOS Y CÉLULAS**

### **8.1. Obtención de los tejidos**

Los ratones se sacrificaron mediante asfixia con CO<sub>2</sub> y a continuación se procedió a la esterilización con etanol al 70% de la zona ventral de los animales y a su disección para extraerles el bazo, que se mantuvo en frío en medio IMDM suplementado.

### **8.2. Obtención de los esplenocitos**

El bazo se colocó en un filtro de nylon de 70  $\mu$ m (Becton-Dickinson), en una placa de Petri de 6 cm que contenía 2 ml de medio IMDM suplementado y se disgregó con la ayuda del émbolo de una jeringuilla en condiciones de esterilidad. Las células se recogieron en un tubo de 50 ml, se centrifugaron 5' a 453 g. Se lisaron los eritrocitos resuspendiendo las células en ml de agua destilada y rápidamente se diluyeron en

medio IMDM suplementado hasta un volumen final de 45 ml, se volvieron a centrifugar 5' a 453 g y se procedió a su conteo con la cámara de Neubauer usando solución de Türk.

### **9. ENSAYO DE SUPRESIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS T**

Para analizar la capacidad de la MO transducida y de las poblaciones de MDSCs transducidas de suprimir la proliferación de los esplenocitos obtenidos de ratones con EAE, se realizó un cocultivo de esplenocitos y de células de MO transducidas o de las poblaciones de MDSCs en medio IMDM suplementado con:

- 10% de FCS *HyClone* (Gibco)
- 2 mM de L-glutamina
- 50 UI/ml de penicilina
- 50 µg/ml de estreptomina
- 2 µM de β-mercaptoetanol (Sigma Aldrich)
- 5 µg/ml de péptido MOG<sub>40-55</sub>

Los esplenocitos se cultivaron a una concentración de 10<sup>6</sup> CMN por ml en presencia de diferentes concentraciones de células de MO transducidas o de las poblaciones de MDSCs, todas ellas irradiadas a 25 Gy, en proporciones que oscilaban entre 8:1 a 0,25:1 (MO:esplenocitos) y entre 2:1 a 1:16 (MDSCs:esplenocitos) Se mantuvieron en cultivo a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 100% de humedad relativa.

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

A las 48 h se añadió 1 µCi de timidina tritiada (<sup>3</sup>H-Thymidine, Perkin Elmer, Waltham, MA, EEUU) para marcar las células en división y 18 h después se cuantificó la incorporación de esta molécula radiactiva en las células cultivadas mediante un contador de centelleo (1450 Microbeta LSC, Wallac, Turku, Finland).

## **Material y Métodos**

### **10. INFUSIÓN DE CÉLULAS: ABORDAJE PREVENTIVO Y TERAPÉUTICO.**

En esta tesis se realizaron dos abordajes, uno preventivo y otro terapéutico.

En el abordaje preventivo se agruparon los animales en dos grupos, ambos recibieron una infusión i.v. de de 200  $\mu$ l de una suspensión de MO, se infundieron  $1 \times 10^6$  CMN de MO por animal. Un grupo recibió la MO transducida con el vector terapéutico liMOG y el otro con el vector control li. Tras siete días los ratones se inmunizaron tal como se describe en el apartado 7.

En el abordaje terapéutico, se inmunizaron ratones C57BL/6J WT tal como se describe en el apartado 7 y, una vez los signos clínicos ya estaba establecidos [día 10 post-inmunización (p.i.)], se randomizaron en 6 grupos de forma que todos los grupos partieron de una puntuación media de score similar entre ellos. Todos los grupos recibieron una infusión i.v. de 200  $\mu$ l de una suspensión celular de MO o de la subpoblación de MDSCs, según se indica en la tabla 9

**Tabla 9: Distribución de los grupos de animales del brazo terapéutico:**

<b>Tipo celular</b>	<b>Número de células</b>	<b>Vector</b>
MO	$1 \times 10^6$ CMN	li
MO	$1 \times 10^6$ CMN	liMOG
MDSC (CD11b <sup>+</sup> Gr-1 <sup>Low</sup> )	$3-5 \times 10^5$ CMN	li
MDSC (CD11b <sup>+</sup> Gr-1 <sup>Low</sup> )	$3-5 \times 10^5$ CMN	liMOG
MDSC (CD11b <sup>+</sup> Gr-1 <sup>High</sup> )	$3-5 \times 10^5$ CMN	li
MDSC (CD11b <sup>+</sup> Gr-1 <sup>High</sup> )	$3-5 \times 10^5$ CMN	liMOG

El seguimiento clínico de los ratones, tanto del abordaje preventivo como del terapéutico se realizó de forma ciega, es decir, el observador no conocía el grupo al que pertenecía cada animal.

## **11. ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES DE CÉLULAS T REGULADORAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO**

El análisis de las diferentes poblaciones de células Treg presentes en los esplenocitos de ratones con EAE se realizó mediante citometría de flujo multicolor utilizando en citómetro de flujo FACS Canto™ como analizador de las diferentes muestras.

### **11.1. Análisis de la población nTreg en esplenocitos**

Para el estudio de las nTreg se realizaron marcajes directos de superficie (apartado 4.2.a) e intracelular, y para ello se utilizaron los anticuerpos descritos en la tabla 10.

#### ***a. Marcaje intracelular directo***

1. Lavar las células ( $0,5 \times 10^6$  CMN de los tejidos hematopoyéticos) con 1 ml de PBA-azida.
2. Bloqueo de los receptores Fc: añadir un 10% de suero de ratón o bien 1  $\mu$ l del anticuerpo de rata anti-CD16/CD32 de ratón e incubar 10' a temperatura ambiente.
3. Fijar y permeabilizar: añadir 250  $\mu$ l de *Cytofix/Cytoperm 1x solution* (BD Pharmingen) e incubar 20' a 4°C.
4. Lavar dos veces con 1 ml de *Perm/Wash buffer* (BD Pharmingen).
5. Resuspender en 50  $\mu$ l de *Perm/Wash buffer* y añadir el anticuerpo específico y el control de isotipo conjugados con fluorocromos. Incubar 30' a 4°C.
6. Lavar dos veces con 1 ml de *Perm/Wash buffer*.
7. Resuspender en 300-400  $\mu$ l de PBA-azida.
8. Analizar en el citómetro de flujo.

## Material y Métodos

Tabla 10 - Marcadores de células nTreg

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	µg/ 10 <sup>6</sup> céls	Fabricante
CD4	APhC/Cy7	IgG2a de rata	GK1.5	0,4	BioLegend
CD25	PE/Cy7	IgG1 de rata	PC61.5	2,8	eBioscience
CD45RB	Biotina	IgG2a de rata	C363.16A	0,12	eBioscience
FoxP3	APhC	IgG2a de rata	FJK-16S	0,2	eBioscience
Estreptavidina	PE	-	-	0,12	BD Pharmingen

### 11.2. Análisis de la población de células reguladoras Tr1

#### a. Obtención de células CD4<sup>+</sup> por separación inmunomagnética

Una vez obtenidos los esplenocitos se procedió a separar las células T CD4<sup>+</sup> del resto de tipos celulares mediante selección negativa utilizando el kit *Mouse CD4<sup>+</sup> T cell enrichment Kit, EasySep* (StemCell Technologies, Vancouver BC, Canadá) y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (Figura 23).

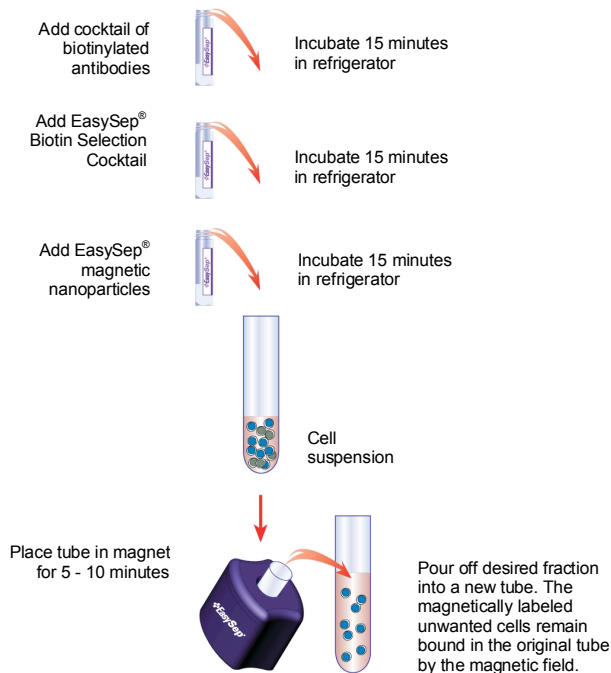


Figura 23 - Esquema del protocolo de separación de células CD4<sup>+</sup> a partir de esplenocitos murinos.

### ***b. Cultivo de estimulación de las células CD4<sup>+</sup>***

Una vez separadas las células CD4<sup>+</sup> del resto de tipos celulares presente en los esplenocitos, las cultivamos en presencia de los anti- $\alpha$ CD3 y anti-CD28 (BD Pharmingen) siguiendo los pasos que a continuación se describen:

- 1- Pre-incubamos una placa de 96 pocillos con 10  $\mu$ g/ml de anti- $\alpha$ CD3 en medio tamponado Tris 0.1 M a pH 9.5 y dejamos la placa toda la noche a 4°C.
- 2- Lavamos la placa con PBS y repartimos las células CD4<sup>+</sup>, que previamente hemos obtenido del proceso de separación (9.2.a), en cada pocillo colocando  $2 \times 10^5$  células CD4<sup>+</sup> en un volumen final de 200  $\mu$ l en medio IMDM suplementado con:
  - 10% de FCS *HyClone* (Gibco)
  - 2 mM de L-glutamina
  - 50 UI/ml de penicilina
  - 50  $\mu$ g/ml de estreptomicina
  - 2  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma Aldrich)
- 3- A las 72 h de iniciar el cultivo, recogemos los sobrenadantes y los congelamos a -180°C en alícuotas de 200  $\mu$ l.

### ***c. Determinación de la concentración de citocinas solubles en el medio de cultivo de células CD4<sup>+</sup>***

En este procedimiento se cuantifica la concentración de citocinas secretadas al medio de cultivo por parte de las células T CD4<sup>+</sup> activadas según el procedimiento descrito en el apartado 9.2.b. Para ello se usó el kit comercial *FlowCytomix Th1/Th2 10plex* (eBioscience), que permite detectar las siguientes citocinas: GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL1- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17 y TNF- $\alpha$ . Este tipo de análisis se basa en esferas que están recubiertas de anticuerpos específicos para las citocinas mencionadas y que

## **Material y Métodos**

tienen dos tamaños distintos (4 y 5  $\mu\text{m}$ ), 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 mismas citocinas (que reconocen otros epítomos 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. El kit también incluye una curva patrón para cada citocina que nos permite determinar la concentración de cada una de ellas en las diferentes muestras analizadas.

## **12. ANÁLISIS, SEPARACIÓN CELULAR Y VALORACIÓN DE LOS DATOS CITOMÉTRICOS**

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

La separación celular de las poblaciones estudiadas se realizó mediante el separador celular MoFlo (Beckman Coulter).

## **Material y Métodos**

Una vez adquiridas o separadas las muestras se analizaron los datos obtenidos con el programa de análisis *FCS Express v3.0* (De Novo Software, Glendale, CA, EEUU). 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:

a. *Eficiencia de transducción*. En un segundo histograma se combinó SS con 7-AAD (FL-3) para excluir las células muertas o apoptóticas. En un tercer histograma se combinaron los parámetros SS con EGFP (FL-1), lo que permitió determinar el porcentaje de células viables que eran EGFP<sup>+</sup>.

b. *Fenotipo de la MO*.

*Marcaje de linaje hematopoyético y población eritroide*: una vez definida la población total con los parámetros SS y FS o la población transducida (EGFP<sup>+</sup>) se combinó el parámetro linaje-ApHC (FL-5) (mezcla realizada en el laboratorio con los anticuerpos anti-CD3, CD4, CD8, CD11b, CD19 y Gr-1 conjugados con el fluorocromo ApHC) con SS para definir la población Lin<sup>-</sup>. Una vez seleccionada la población Lin<sup>-</sup> se analizó la presencia de eritrocitos o progenitores de serie roja combinando los parámetros CD45.1-ApHC/Cy7 (FL-6) con Ter119-PE/Cy5 (FL-3).

- *Marcaje de células T y NK*. Para analizar los diferentes estados de maduración de la población de células T se combinó el parámetro CD3-PE (FL-2) con CD4-PerCP (FL-3) o con CD8-ApHC (FL-5) y también el parámetro CD4-PerCP con CD8-ApHC. Para el análisis de la población de células NK se hicieron dos histogramas en los que se combinaban los parámetros NK1.1-PE/Cy7 (FL-4) con SS o con CD3-PE. Esta combinación de parámetros se realizó tanto sobre la

## **Material y Métodos**

población total como sobre la población EGFP<sup>+</sup> seleccionada en un histograma previo donde se combinó el parámetro EGFP (FL-1) con el SS. De esta forma se podía analizar la presencia de células T y NK en la población total y en las poblaciones transducidas (EGFP<sup>+</sup>).

- *Marcaje de células B.* La presencia de células B se cuantificó tanto en la población transducida (EGFP<sup>+</sup>) como en la total utilizando los parámetros B220-PerCP y CD19-ApHC.
  
  - *Marcaje de células mieloides.* Una vez seleccionada la población a analizar (población total o EGFP<sup>+</sup>) se combinó el parámetro CD11b-ApHC (FL-5) con Gr-1-PE/Cy7 (FL-4) y CD11b-ApHC (FL-5) con CD11c-PerCP (FL-3) para analizar las diferentes poblaciones mieloides. Una vez definidas y seleccionadas las diferentes poblaciones (granulocitos, Mφs, DCs, etc.) se usó el parámetro FL-2 para analizar la expresión de CD80, CD86, CD40 y CD14 en las diferentes poblaciones.
- b. MDSCs. Tras definir la población se combinó el parámetro CD11b-ApHC (FL-5) con Gr-1-PE/Cy7 (FL-4) y se definieron las subpoblaciones de MDSCs (CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>High</sup>, CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>Low</sup>). Una vez seleccionada la población doble positiva se realizaron dos histogramas en los que se combinaron los parámetros CD124-PE (FL-2) y F4/80-PerCP (FL-3) con “Counts” para analizar la expresión de la subunidad α del receptor de la IL-4 (CD124) y del marcador mielóide F4/80.
- c. Células mesenquimales. Una vez definida la población total y la EGFP<sup>+</sup> se combinó el parámetro Lin-ApHC con CD45.1-ApHC/Cy7 y se definió la población negativa para ambos como la población enriquecida en células mesenquimales, de aquí se analizaron una serie de parámetros para definir la población mesenquimal, primero se combinó el parámetro CD29-FITC (FL-1) con CD44-PerCP (FL-3), se seleccionó la población doble positiva y en esta se analizó la expresión de CD105, CD90.1,

## **Material y Métodos**

MHC-I (H2k<sup>b</sup>) y MHC-II (I-A<sup>b</sup>) [todos conjugados con PE (FL-2)] combinándolos, por separado, con SS.

- d. Células nTreg. Después de definir la población total se combinaron los parámetros CD4-APhC/Cy7 (FL-6) con SSC, para seleccionar la población CD4<sup>+</sup>, de esta forma fijamos la población CD4<sup>+</sup> y reducimos la variabilidad que presenta esta población. Sobre la población CD4<sup>+</sup> se combinaron los parámetros CD45RB-PerCP (FL-3) con CD4-APhC/Cy7 (FL-6) para seleccionar la población CD4<sup>+</sup>.CD45RB<sup>low</sup> descrita como una población enriquecida en nTregs. Una vez seleccionada dicha población se usaron los parámetros CD25-PE/Cy7 (FL-4) y FoxP3 (FL-2) para analizar dichas subpoblaciones.
- e. Determinación de la concentración de citocinas solubles. 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).

### **13. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

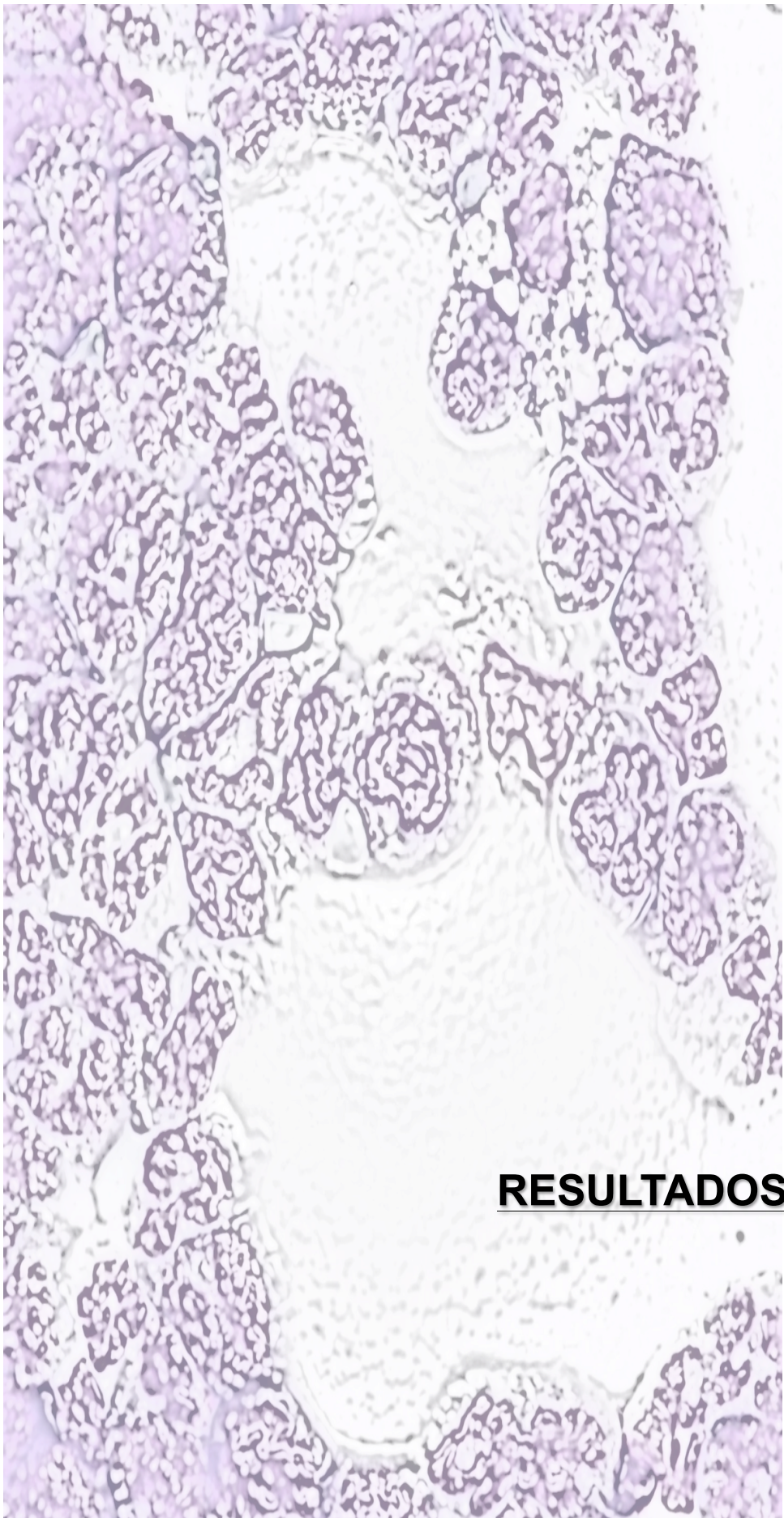
Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa informático GraphPad Prism v4.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA, EEUU), con el que también se generaron las figuras.

Se aplicaron pruebas paramétricas cuando la distribución de los datos de los grupos a comparar era normal (de varianzas similares). La prueba *t* de Student se utilizó cuando se comparaban medias de dos conjuntos de datos independientes (o apareados). La prueba de ANOVA de un factor se aplicó para el estudio de la varianza de una variable cuantitativa dependiendo en más de dos conjuntos de datos independientes, aplicando posteriormente la prueba de Bonferroni para comparar los conjuntos de datos dos a dos.

## **Material y Métodos**

Cuando la distribución de los datos no era normal (varianzas diferentes) se aplicó la prueba estadística no paramétrica  $U$  de *Mann-Whitney* para la comparación de la media de dos conjuntos de datos independientes.

En todos los casos se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas cuando la  $p$  era inferior a 0,05.



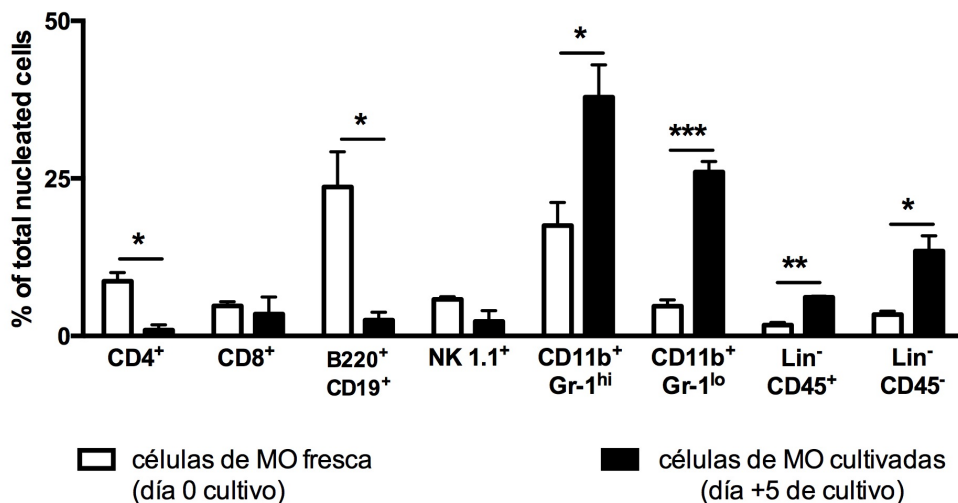
## **RESULTADOS**



**1. DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO DE LA MO TRANSDUCIDA**

Con el objetivo de identificar y caracterizar la población celular responsable de la inducción de tolerancia inmunológica observada en el modelo de EAE (Eixarch et al. 2009) se procedió, inicialmente, a analizar el fenotipo de la MO fresca y transducida (tras cinco días en cultivo en presencia de vectores retrovirales). Para ello se sometieron las células de la MO a los protocolos estándares de transducción y 24 h después del segundo ciclo de transducción se analizó su fenotipo mediante citometría de flujo.

Se analizaron marcadores de linaje T, B, mieloide y eritroide, tanto al inicio del cultivo como al final de este, observando que tras cinco días de cultivo (día en que las células son trasplantadas) se identificaban tres poblaciones mayoritarias, dos con fenotipo mieloide ( $CD11b^+ Gr-1^{high}$  y  $CD11b^+ Gr-1^{low}$ ), que representan el  $31,9 \pm 10,2\%$  y el  $26,0 \pm 3,3\%$  de la población total, respectivamente, y una tercera que presentaba ausencia de marcadores de linaje hematopoyético ( $Lin^- CD45^-$ ) y que suponía un  $13,5 \pm 4,2\%$  del total de las células (Figura 24). En contraste con lo que se observaba en la MO fresca, a día cinco de cultivo apenas había representación del resto de linajes hematopoyéticos.

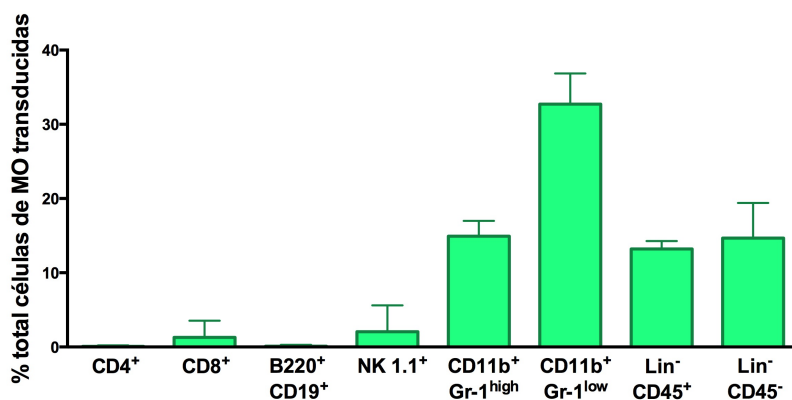


**Figura 24 - Análisis del fenotipo de la MO:** Representación gráfica del porcentaje de las distintas poblaciones analizadas en la MO al inicio y final del cultivo. Las barras indican el SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ;  $n = 3$ .

## Resultados

Dichas poblaciones celulares (las dos mieloides y la no hematopoyética) son las que mayor eficiencia de transducción presentaban (CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup>: 32,7 ± 4,1%; CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low</sup>: 14,9 ± 3,5%; Lin<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup>: 14,6 ± 4,7%) (Figura 25).

La observación previa de que el efecto terapéutico que habíamos observado en el modelo de EAE, con células de MO, se producía cuando habían sido transducidas con el autoantígeno y no con el vector control demostraba que este efecto era antígeno-específico (Eixarch et al. 2009) e indicaba que debía de estar mediado por alguna población de células transducidas. Por ello, hipotetizamos que alguna de estas tres poblaciones, sola o en combinación, eran las mejores candidatas a mediar la inducción de tolerancia en el modelo de EAE.

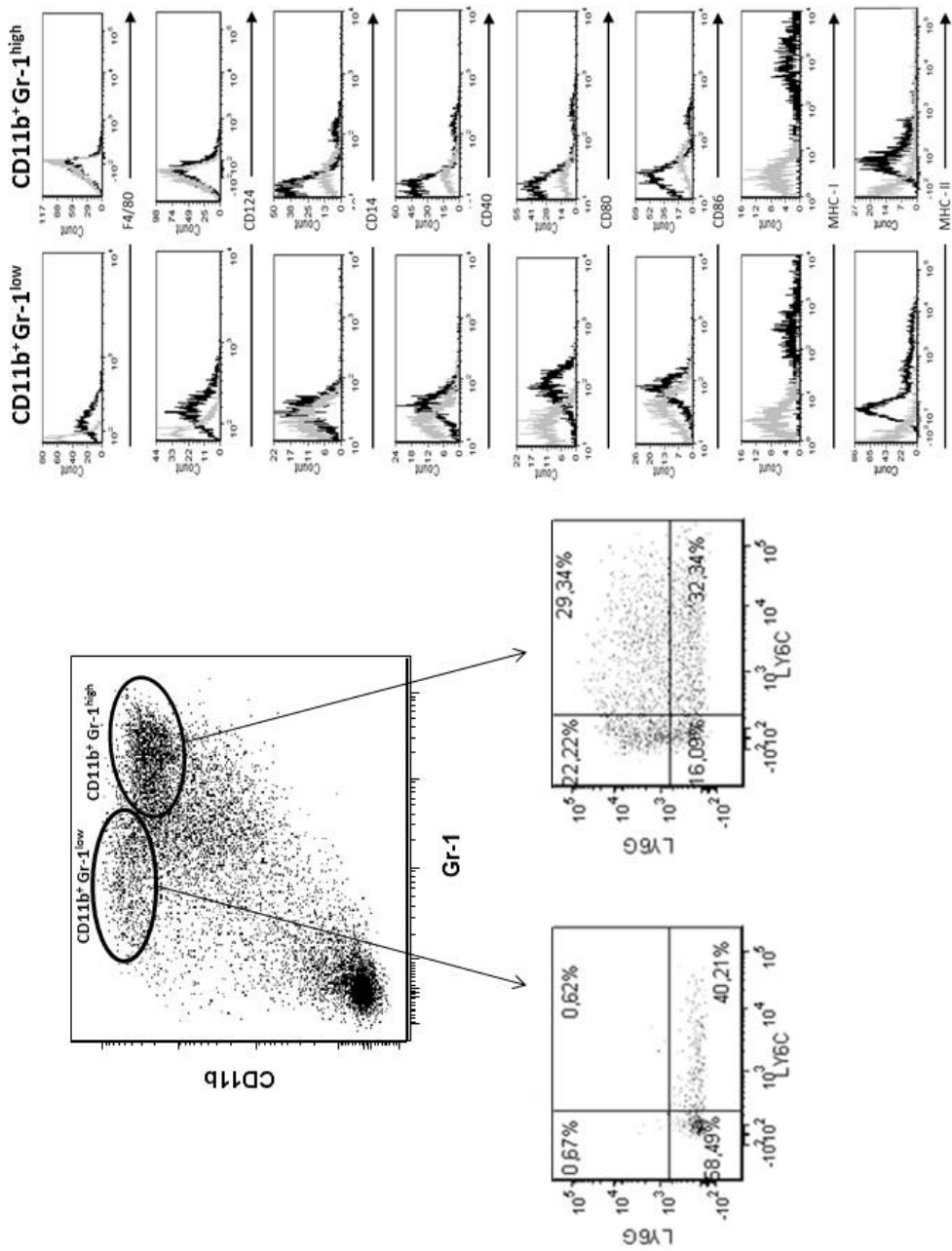


**Figura 25 - Análisis del fenotipo de la MO transducida:** Representación del porcentaje de cada población dentro de la población transducida (EGFP<sup>+</sup>). La barras indican el SEM. n=3

## 2. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LAS POBLACIONES CANDIDATAS.

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

Se analizó el fenotipo de las dos poblaciones mieloides y de la población que no expresaba marcadores hematopoyéticos. En las dos poblaciones mieloides se

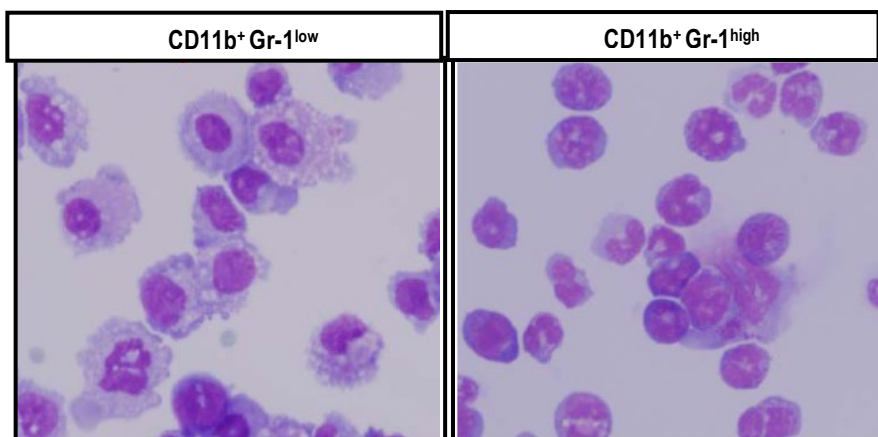


**Figura 26 - Análisis fenotípico de las dos poblaciones mieloides.**  
 Se muestra un dot plot y un histograma representativo de cada marcaje. Al finalizar el cultivo de MO se analizaron marcadores de células mieloides y de células presentadoras de antígeno (APCs), y se realizó el análisis diferencial de los antígenos Ly6C y Ly6G

## **Resultados**

analizaron marcadores que caracterizan a las MDSCs y se observó que la población CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup> no presentaba niveles detectables de F4/80 ni CD124 (subunidad  $\alpha$  del receptor de IL4 e IL-13), mientras que la población CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low</sup> sí expresaba CD124 y bajos niveles de F4/80 (Figura 26). Estos resultados nos indican que la población CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low</sup> presenta un fenotipo compatible con el de las MDSCs monocíticas (CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low</sup> F4/80<sup>low</sup> CD124<sup>+</sup>).

Por otra parte, se analizó la expresión diferencial de Ly6C y Ly6G, dos moléculas que comparten un epítipo común reconocido por el anticuerpo monoclonal Gr-1 y, a su vez, se analizó la expresión de marcadores característicos de células mieloides y de DCs. Se observó que el 48,04  $\pm$  5,3 % de la población CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low</sup> expresaba niveles altos de Ly6C y no expresaba Ly6G en su superficie y que dentro de la población CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup> se podían observar una distribución uniforme de la expresión de los dos marcadores Ly6C y Ly6G, sin poder definir las tres poblaciones descritas dentro de la población CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup>: Ly6C<sup>high</sup> Ly6G<sup>-</sup> (monocítica), Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> y Ly6C<sup>-</sup> Ly6G<sup>+</sup> (granulocítica) (Figura 26).

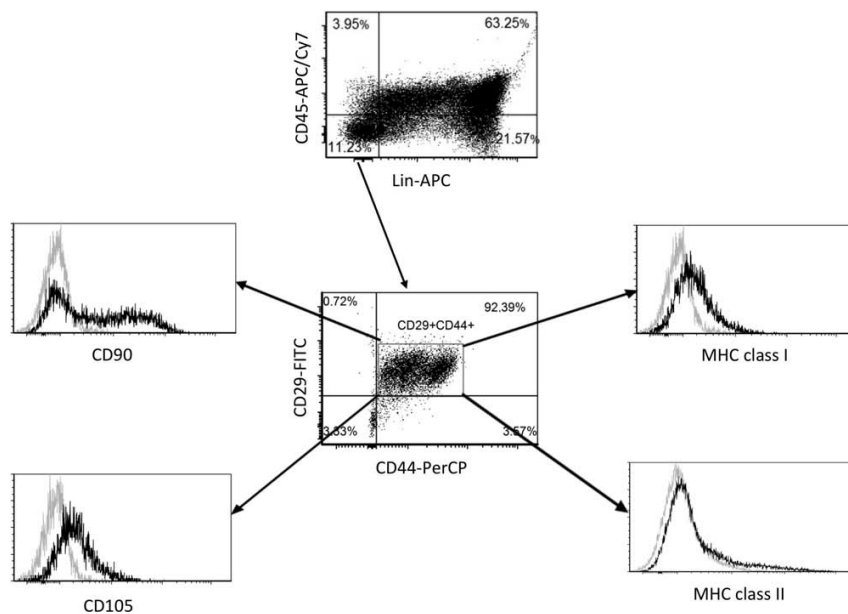


**Figura 27 - Marcaje de May-Grünwald Giemsa de las poblaciones CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low</sup> y CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup>.** La población CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low</sup> presentó una morfología monocítica (núcleo circular centrado y citoplasma amplio) y CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup> presentaba una morfología metamielocítica granulocítica (núcleo hendido o segmentado y citoplasma compacto con múltiples gránulos).

## Resultados

Para caracterizar mejor ambas poblaciones mieloides se aislaron mediante un separador celular (Moflo) y se sometieron a una tinción de May-Grünwald Giemsa para su observación microscópica directa. Como se muestra en la Figura 27, observamos que ambas poblaciones tenían una morfología diferente, las CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low</sup> presentaban una morfología monocítica: núcleos circulares centrados y citoplasmas amplios con variedad en el número de gránulos; en cambio las CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup> tenían una morfología granulocítica: núcleos segmentados y citoplasmas compactos y con presencia de múltiples gránulos.

Por otro lado, en la población celular CD45<sup>-</sup> Lin<sup>-</sup> EGFP<sup>+</sup> se analizó la expresión de distintos marcadores característicos de células mesenquimales, observándose que mayoritariamente presentaban el fenotipo Lin<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup> CD29<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> CD105<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> MHC-I<sup>low</sup> MHC-II<sup>-</sup>, que es característico de la población de células mesenquimales (Figura 28).



**Figura 28 - Análisis fenotípico de la población no hematopoyética (Lin<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup>) transducida.** Se presenta un dot plot y un histograma representativo de cada marcaje. Las flechas indican la estrategia de análisis que se siguió.

## **Resultados**

### **3. ACTIVIDAD ARGINASA-1 Y PRODUCCIÓN DE NITRITOS EN LAS DISTINTAS POBLACIONES DE CÉLULAS MIELOIDES.**

Para caracterizar funcionalmente las poblaciones candidatas se cuantificó la actividad arginasa-1 y la producción de NO, dos de los principales mecanismos efectores del efecto supresor descrito para estas células, tanto en la MO no fraccionada como en las poblaciones candidatas purificadas. Observamos que la MO no fraccionada, tras ser estimulada con IFN- $\gamma$  y LPS, presentaba un aumento de la actividad arginasa-1 ( $71,0 \pm 30,2$  mU arginasa) y producía más NO $_2^-$  ( $7,4 \pm 5,7$   $\mu$ M NO $_2^-$ ) en comparación con la situación basal ( $60,2 \pm 30,5$  mU arginasa y  $1,2 \pm 1,03$   $\mu$ M NO $_2^-$ ). Analizando estos mismos marcadores bioquímicos en las tres poblaciones candidatas, tras ser estimuladas con IFN- $\gamma$  y LPS, se observó que la población CD11b $^+$  Gr-1 $^{low}$  tenía niveles significativamente más altos de actividad arginasa-1 y de producción de NO $_2^-$  ( $79,2 \pm 17,7$  mU arginasa y  $10,7 \pm 4,4$   $\mu$ M NO $_2^-$ ) en comparación con las otras dos poblaciones, la CD11b $^+$  Gr-1 $^{high}$  ( $16,4 \pm 3,5$  mU arginasa-1 y  $0,4 \pm 0,9$   $\mu$ M NO $_2^-$ ) y la Lin $^-$  CD45 $^-$  ( $30,8 \pm 12,5$  mU arginasa y  $0,8 \pm 0,8$   $\mu$ M NO $_2^-$ ) (Figura 30).

Estos resultados nos indican que la población CD11b $^+$  Gr-1 $^{low}$  es la principal responsable de la producción de NO $_2^-$  y del aumento de actividad arginasa-1 observado en la MO total.

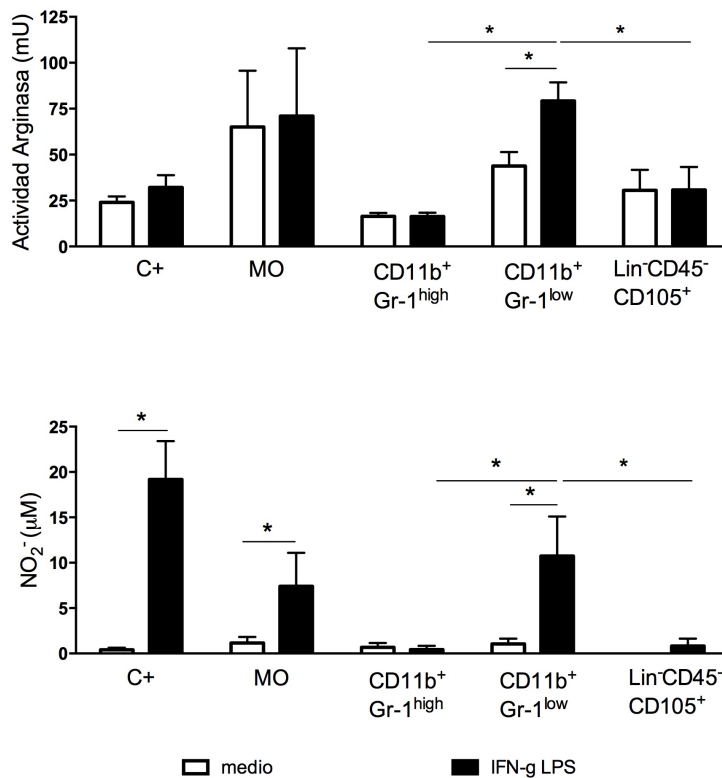
### **4. ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD SUPRESORA DE LA MO Y DE LAS SUBPOBLACIONES MDSC<sub>s</sub>**

Una vez caracterizadas fenotípicamente las poblaciones candidatas y tras comprobar que expresaban arginasa-1 y producían NO $_2^-$ , se procedió a estudiar la capacidad de suprimir la respuesta proliferativa de esplenocitos frente a estímulos antigénicos, tanto por parte de la MO total como de dos de las tres poblaciones candidatas.

## Resultados

Las MSCs no se pudieron utilizar en este ensayo debido a la baja recuperación de células después de la separación celular, y a partir de ahora el resto de ensayos *in vitro* e *in vivo* se realizan sólo con las dos subpoblaciones de MDSCs.

Para ello se cocultivaron esplenocitos de ratones inmunizados con MOG<sub>40-55</sub> con células de MO o de las poblaciones purificadas, transducidas con el vector SF91-liMOG-IRES-EGFP (grupo liMOG) o con el vector control SF91-li-IRES-EGFP (grupo li), en distintas proporciones, y a las 72 h se cuantificó la proliferación celular mediante la incorporación de timidina tritiada.



**Figura 30: Determinación de los niveles de producción de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y de la actividad arginasa en MO total y en las poblaciones celulares candidatas.** Representación de la media de actividad arginasa y de la media de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Las barras indican el SEM. C+: control positivo, células WEHI-3B sometidas al mismo estímulo que las células de estudio. \*p < 0,05; n=3.

## **Resultados**

Los resultados obtenidos en los ensayos de supresión nos muestran que la MO tiene capacidad de suprimir la proliferación de los esplenocitos de una forma dosis dependiente, tanto de forma inespecífica (Ii) como antígeno-específica (IiMOG) si bien en este último caso, tanto para la MO total como para las células CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low</sup>, la actividad supresora antígeno-específica (IiMOG) fue significativamente superior a la no específica (Ii) (Figura 31). Observando los resultados obtenidos con las poblaciones purificadas se comprueba que la población CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low</sup> tiene un patrón de supresión de la proliferación similar al de la MO, en cambio la población CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup> sólo tiene capacidad de suprimir la proliferación de forma inespecífica ya que se observa el mismo porcentaje de supresión en las células transducidas con IiMOG que con Ii y además no se observa una respuesta dosis dependiente tal y como hemos observado con la MO y con la población CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low</sup>.

### **5 - LA IL-3 JUEGA UN PAPEL IMPORTANTE EN LA GENERACIÓN DE CÉLULAS MIELOIDES.**

Una vez caracterizadas las poblaciones de la MO, tanto fenotípicamente como su funcionalidad, se procedió a analizar qué factor o factores (citocinas) contribuían en mayor medida a la diferenciación hacia MDSCs de las células de MO en los cultivos de transducción.

Para ello se cultivaron las células en presencia del medio condicionado BHK/MKL (fuente de mSCF) y de la combinación de los medios condicionados BHK/MKL y WEHI-3B (fuente de mIL-3) y al final del cultivo se hizo un conteo celular y se analizó el fenotipo de la MO en cada una de las combinaciones realizadas.

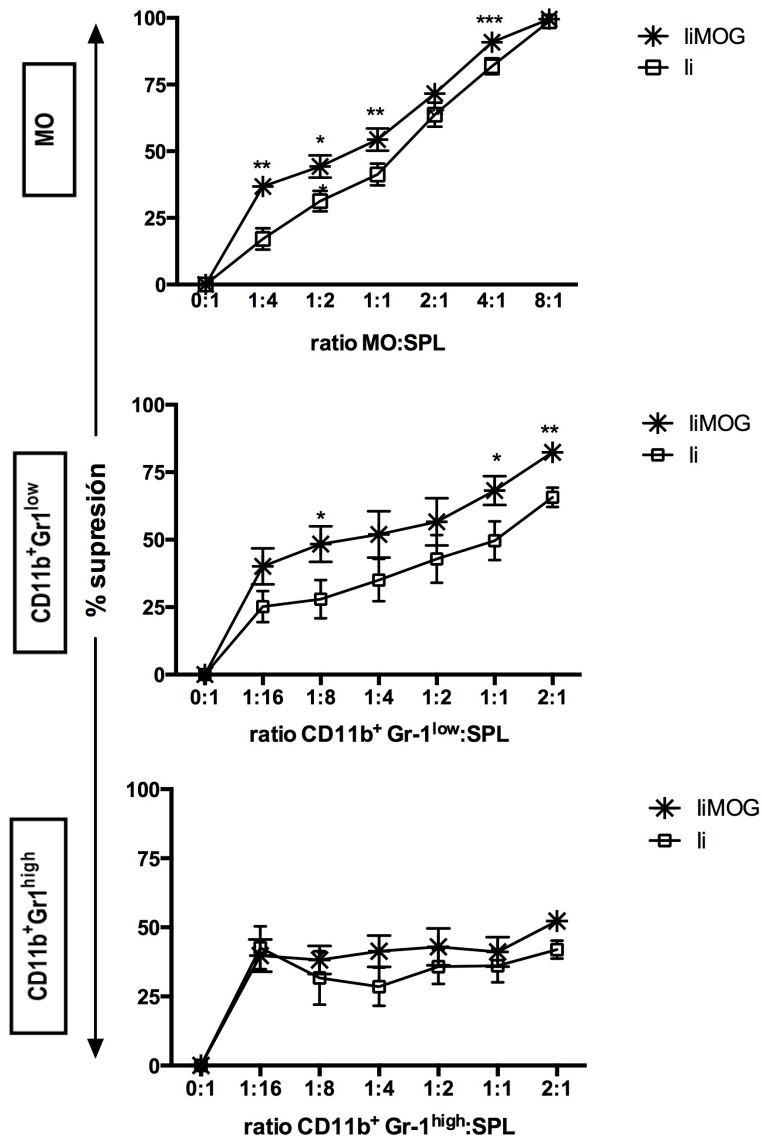
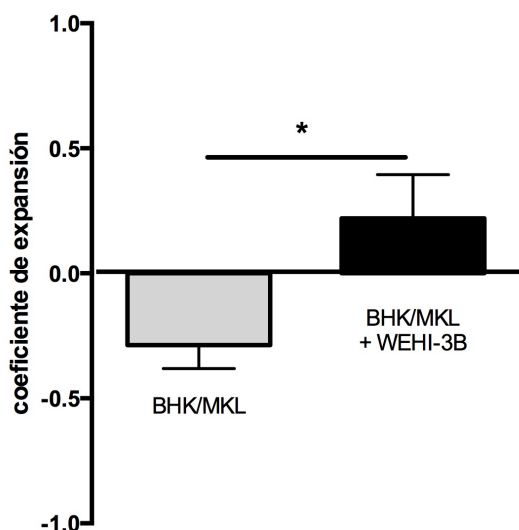


Figura 31 - Análisis de la capacidad supresora de la MO y de las poblaciones celulares mieloides candidatas. Gráfico representativo de la media del porcentaje de supresión de uno de los experimentos. Las barras indican el SEM.

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ;  $n = 3$

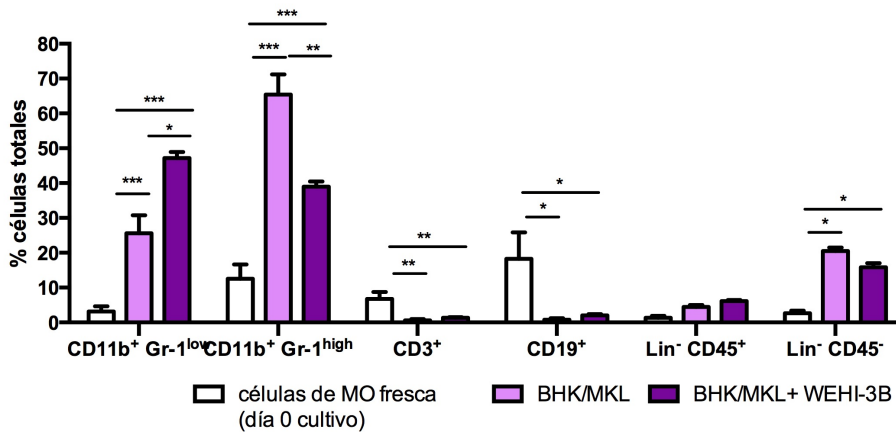
## Resultados

A nivel de número de células lo que se observó es que el medio condicionado WEHI-3B era necesario para la expansión de las células en cultivo o, al menos, del mantenimiento del número de células inicial ya que el medio BHK/MKL por sí solo no conseguía mantener el número de células inicial (Figura 32).



**Figura 32 - Coeficiente de expansión de las células de MO cultivadas con las dos condiciones de medios condicionados: BHK/MKL o la combinación BHK/MKL+WEHI-3B**  
Representación de la media de coeficiente de expansión. Las barras indican el SEM.  
\* $p < 0,05$ ;  $n = 3$ .

Analizando el fenotipo celular en estas dos condiciones de cultivo se observó que, en general, el cultivo de MO provoca un aumento en el porcentaje de células con fenotipo mieloides y mesenquimal, pero de forma más concreta, la combinación de los medios condicionados BHK/MKL y WEHI-3B favorece la expansión de la población  $CD11b^+ Gr-1^{low}$  ( $47,2 \pm 1,8\%$ ) en comparación con el efecto del medio BHK/MKL por sí solo ( $25,6 \pm 5,2\%$ ). Este efecto sucede justo al contrario en la población  $CD11b^+ Gr-1^{high}$ , donde obtenemos un mayor porcentaje cuando sólo utilizamos el medio BHK/MKL ( $65,4 \pm 5,1\%$ ) en comparación con la combinación BHK/MKL + WEHI-3B ( $38,9 \pm 1,7\%$ ) (Figura 33).

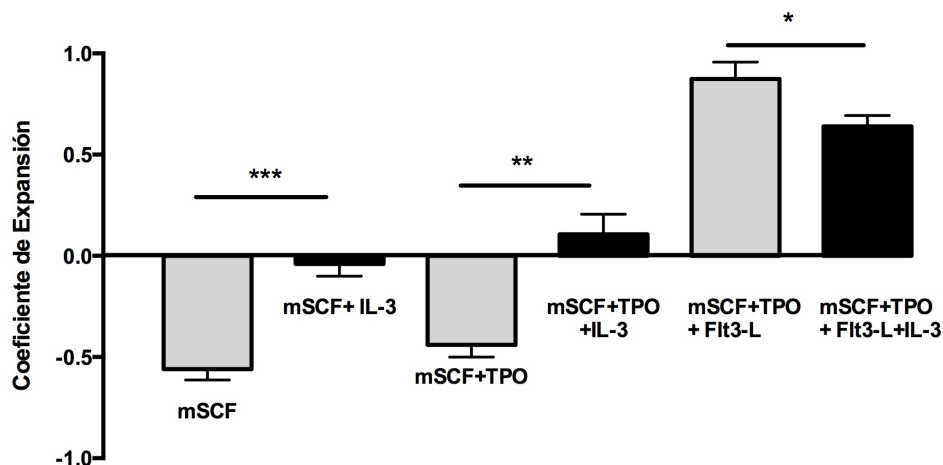


**Figura 33 - Análisis del fenotipo de las células de MO.** Representación gráfica del fenotipo de MO en fresco y cultivado con dos condiciones de medios condicionados: BHK/MKL o la combinación BHK/MKL + WEHI-3B. La barra indica el SEM.  
\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ;  $n = 3$ .

A partir de estos resultados nos planteamos si la presencia de IL-3 estaba favoreciendo la diferenciación y/o la expansión de la población mielode supresora. Para comprobar si esta hipótesis era cierta se procedió a cultivar la MO con diferentes combinaciones de citocinas recombinantes, concretamente se utilizaron seis combinaciones: mSCF, mSCF + mL-3; mSCF + TPO, mSCF + TPO + mL-3; mSCF + TPO + Flt3-L; mSCF + TPO + Flt3-L + mL-3. En todas ellas se analizó el coeficiente de expansión del cultivo y el fenotipo de la MO.

En el análisis de la expansión de las células totales en cultivo observamos que la presencia de la IL-3 combinada con mSCF o con mSCF y TPO aumentaba el coeficiente de expansión en cambio en presencia de mSCF, TPO y Flt3-L este efecto se perdía observando una mayor expansión cuando la IL-3 estaba ausente de la combinación de citocinas (Figura 34).

## Resultados



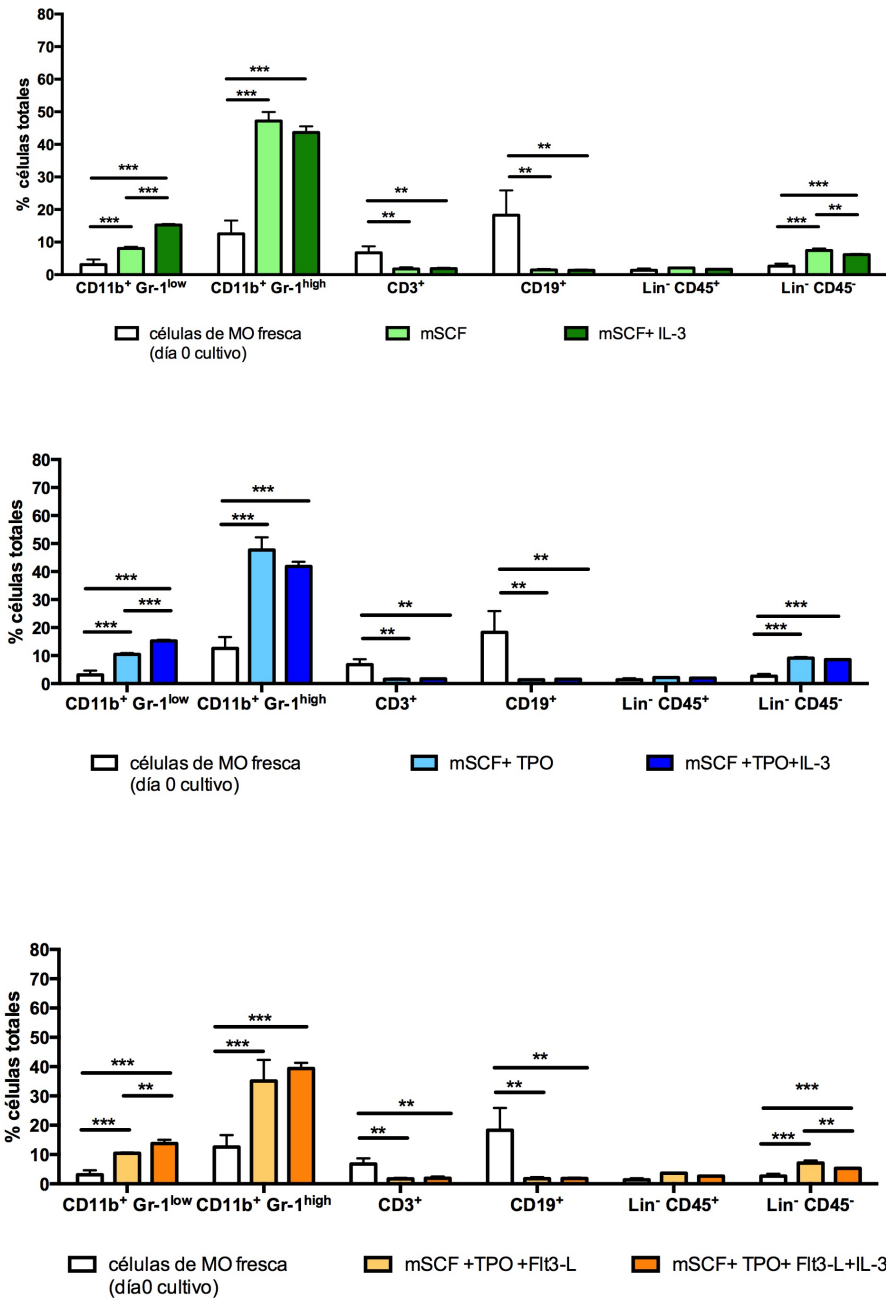
**Figura 34 - Coeficiente de expansión del cultivo de MO con diferentes combinaciones de citocinas recombinantes.** Representación grafica de la media del coeficiente de expansión. La barra indica el SEM. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ;  $n = 3$ .

A nivel de análisis de fenotipo se observó el mismo efecto que con los medios condicionados, es decir, que la presencia de la IL-3, independientemente de la combinación de citocinas, aumentaba el porcentaje de la población CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low</sup> (Figura 35).

Estos resultados nos sugieren que la IL-3 es una citocina que en general favorece la diferenciación hacia células mieloides y que podría estar implicada en la generación de células con actividad supresora.

## 6- LA INFUSIÓN DE CÉLULAS DE MO TRANSDUCIDAS DE FORMA PREVENTIVA MEJORA EL CURSO CLINICO DE LA EAE

Con el fin de confirmar si el sistema seguía funcionando y estudiar si las células de la MO transducidas con el autoantígeno eran capaces de prevenir el desarrollo de la EAE realizamos un ensayo *in vivo* en el que se administraron células de MO antes de inducir la enfermedad y sin tratamiento mieloablatoivo.



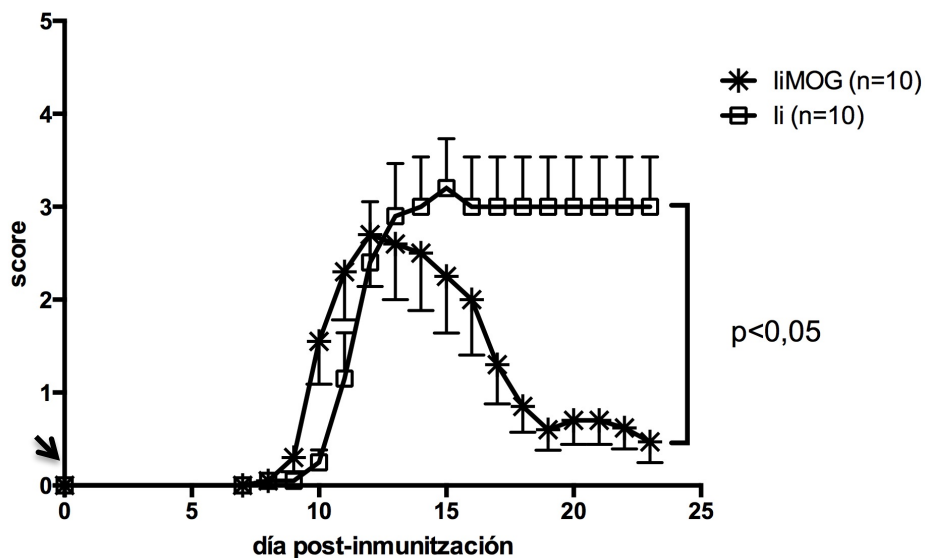
**Figura 35 - Análisis del fenotipo de la MO cultivada con diferentes combinaciones de citocinas recombinantes.** Representación gráfica de la media de porcentaje del fenotipo de las células de MO en fresco y cultivadas con diferentes combinaciones de citocinas. La barra indica el SEM.

\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ;  $n = 3$

## Resultados

Para ello se infundieron  $10^6$  células de MO transducidas con el vector liMOG/EGFP (grupo liMOG) o con el vector control li/EGFP (grupo li) en ratones hembras C57BL/6J de siete semanas. Siete días después de la infusión de las células se inmunizaron los ratones con el péptido encefalitogénico MOG<sub>40-55</sub>. Después de la inmunización se realizó el seguimiento clínico de forma ciega para eliminar el sesgo subjetivo del evaluador.

Al ser un abordaje preventivo, esperábamos que los animales del grupo liMOG no desarrollaran la EAE o desarrollaran una enfermedad más leve. Sin embargo, los animales sí que desarrollaron signos clínicos, al mismo nivel que los controles. Con todo, una vez la enfermedad estaba presente en todos los animales se observó cómo los ratones del grupo liMOG mejoraban sus signos clínicos de forma significativa en comparación con el grupo control li y esta mejoría clínica se mantuvo hasta el final del experimento (Figura36).



**Figura 36 - Mejoría de los signos clínicos de los ratones tratados con el autoantígeno de una forma preventiva no mieloablativa.** 7 días después de la inyección de  $10^6$  células de MO transducidas con los vectores liMOG o li y sin acondicionamiento previo, se inmunizaron los ratones con el péptido MOG<sub>40-55</sub> y se realizó el seguimiento de los signos clínicos. La flecha indica el día de infusión de las células. La gráfica representa la media de la puntuación clínica diaria para cada grupo experimental. Las barras indican el SEM. El valor de p representa la significancia estadística entre la puntuación clínica acumulada de cada grupo.

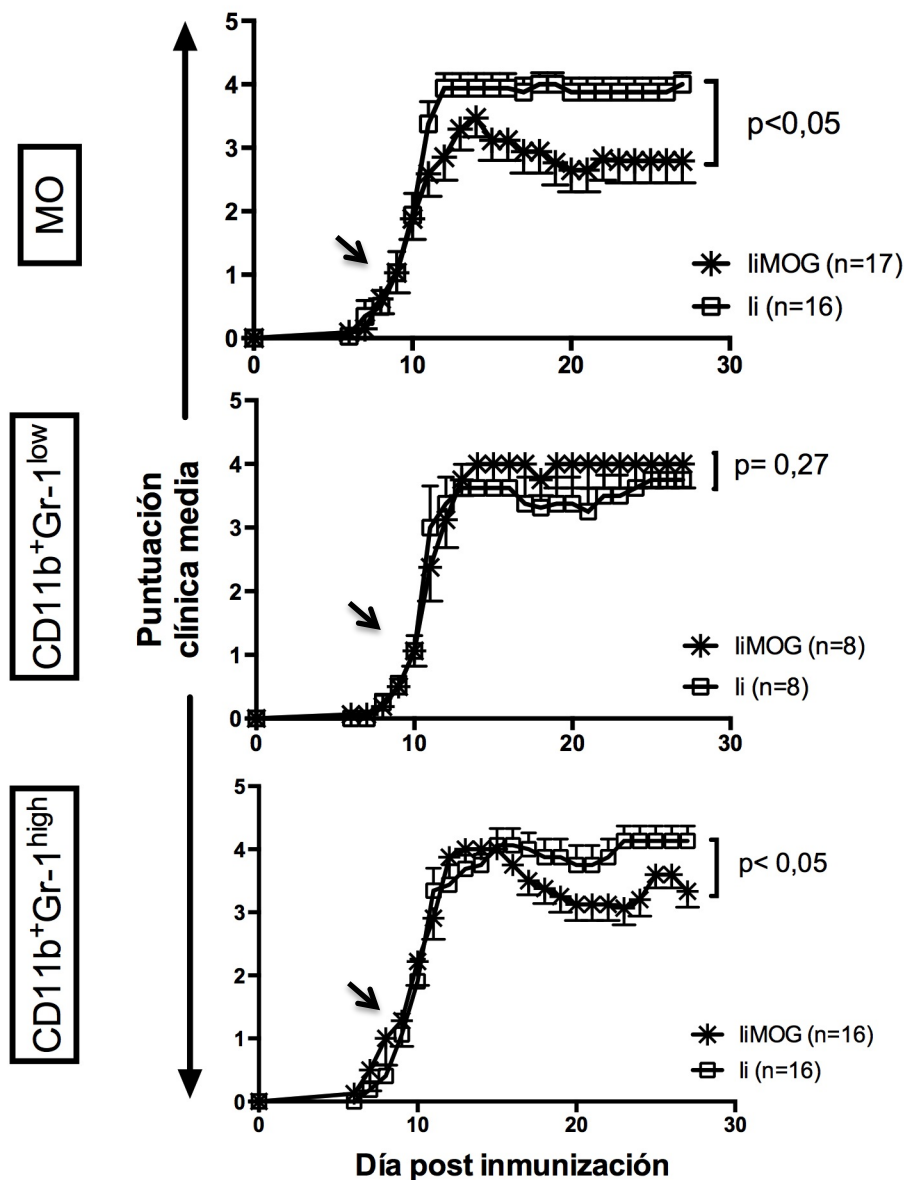
### 7- LAS MDSCs ESTAN IMPLICADAS EN LA MEJORA CLINICA DE LA EAE

Después de la caracterización fenotípica de las diferentes poblaciones celulares presentes en los cultivos de MO y comprobada su funcionalidad *in vitro* se procedió a estudiar su efecto, por separado, en un estudio *in vivo*.

Para ello se inmunizaron ratones C57BL/6J con el péptido encefalitogénico MOG<sub>40-55</sub>, a día 10 p.i., una vez habían aparecido los signos clínicos en la mayoría de los animales, y en ausencia de acondicionamiento se realizó la infusión de  $1 \times 10^6$  células de MO o  $3-5 \times 10^5$  células de las poblaciones CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup> o CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low</sup> transducidas con el vector liMOG/EGFP (grupo liMOG) o con el vector control li/EGFP (grupo li). Después de la infusión de las células se realizó el seguimiento clínico de forma ciega para eliminar el sesgo subjetivo del evaluador. Se definió como remisión la mejoría en la puntuación clínica durante tres días consecutivos respecto a la puntuación máxima alcanzada, mientras que la recuperación completa se definió como la remisión total de los signos clínicos (puntuación clínica = 0).

Tal y como se había observado en un estudio previo (Eixarch et al. 2009), los animales de los grupos liMOG, infundidos con células de MO total, presentaron una mejoría de los signos clínicos obteniendo una menor puntuación clínica acumulada respecto a la del grupo control li ( $57,8 \pm 23,03$  versus  $74,9 \pm 15,2$ ;  $p < 0,05$ ). En el caso de las dos subpoblaciones de MDSCs observamos, en contraste con los resultados obtenidos *in vitro*, que los ratones tratados con la población CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup> transducida con el vector liMOG presentaban una menor puntuación clínica acumulada que el grupo control li ( $64,9 \pm 10,6$  versus  $74,03 \pm 17,5$ ;  $p < 0,05$ ), mejoría que no se observó en los ratones que habían recibido la infusión de células de la población CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low</sup> transducida con el vector liMOG, que presentaban una puntuación clínica acumulada muy similar a la del grupo control li ( $78,8 \pm 11,2$  versus  $72,2 \pm 13,1$ ;  $p = 0,27$ ) (Figura 37).

## Resultados



**Figura 37 - Mejoría de los signos clínicos en los ratones tratados con células de la MO y células CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup> transducidas con el autoantígeno.** Una vez establecida la enfermedad, se inyectaron i.v.  $10^6$  células de la MO transducidas con los vectores liMOG o li o  $3-5 \times 10^5$  células de las poblaciones CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low</sup> o CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup>. Estos gráficos representan la media de la puntuación clínica diaria para cada grupo experimental, las barras representan el SEM. Las flechas indican el día de infusión de las células.

Estos gráficos representan la suma de tres experimentos independientes. Los valores de p representan la significancia estadística de la puntuación clínica acumulada.

Tanto en el grupo tratado con células de la MO como en el grupo tratado con la población CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup> aproximadamente el 50% de los animales de cada grupo experimentaron una remisión de la enfermedad (47,1% (8 de 17) en los animales tratados con MO-liMOG y 56,25% (9 de 16) tratados con células CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup> liMOG) si bien sólo uno (5,88%) de los animales tratados con la MO se recuperó completamente frente a ningún animal del grupo CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup>. Los animales de este último grupo presentaban una mejoría transitoria ya que 4 de los 9 (44,44%) ratones con mejoría clínica experimentaron una recaída de la EAE hacia el final del seguimiento clínico.

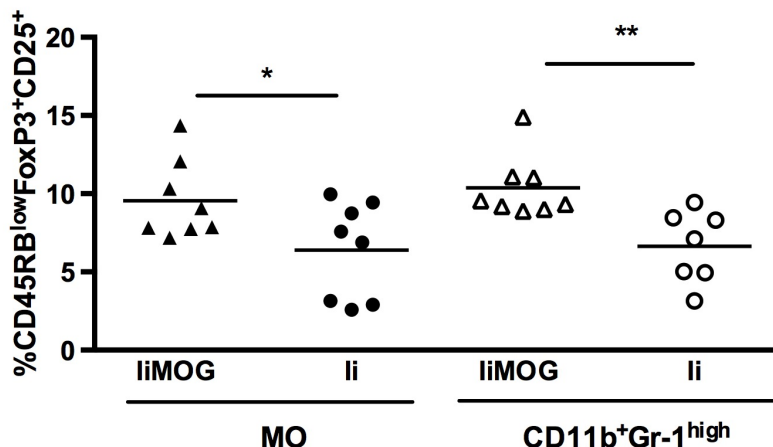
### **7.1 - Aumento de la población de células Treg en los ratones tratados con células transducidas con el autoantígeno.**

Un mes después de la inducción de la EAE y 20 días después de la infusión de las células se analizó la presencia de células Treg, tanto naturales (nTreg) como inducidas (Tr1), en el bazo de los ratones.

El análisis de las nTreg se realizó mediante citometría de flujo utilizando marcadores característicos de esta población (CD45RB<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>) en los esplenocitos totales de los ratones y el análisis de la Tr1 se realizó estudiando el patrón de citocinas secretadas por las células T CD4<sup>+</sup> purificadas después de ser activadas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 48 h. Las citocinas estudiadas fueron las siguientes: GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL1- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17 y TNF- $\alpha$ .

Se observó una mayor proporción de células nTreg en los esplenocitos de los ratones que habían recibido la infusión de células de MO y en los ratones infundidos con la población CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup> transducidas con el vector liMOG que en los ratones tratados con el vector control (li) (Figura 38).

## Resultados



**Figura 38 - Presencia de células nTreg en los ratones tratados con el vector liMOG.**

El gráfico representa el porcentaje de células CD45RB<sup>low</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> dentro de la población de células CD4<sup>+</sup>

\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ .

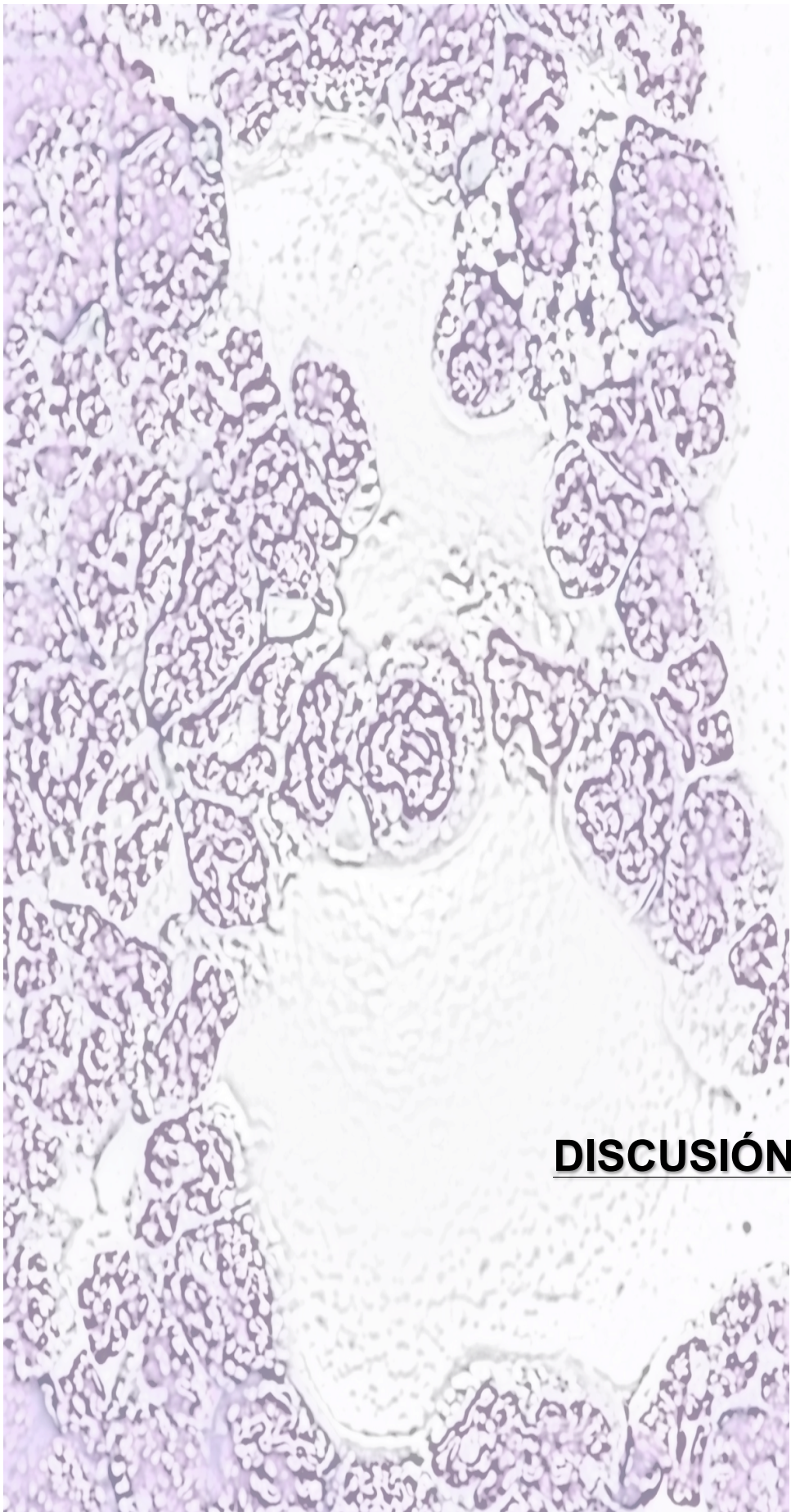
En el análisis del patrón de citocinas secretadas por las células T CD4<sup>+</sup> no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes grupos lo que sugería que no había un aumento en la población Tr1 (CD4<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> IL-4<sup>low</sup> IL-5<sup>+</sup>) (Tabla 11).

**Tabla – 11. Concentración de citocinas secretadas al sobrenadante del cultivo celular**

	MO			CD11b <sup>+</sup> Gr-1 <sup>high</sup>		
	liMOG	li	Valor de p	liMOG	li	Valor de p
IL-1 $\alpha$	31,21 $\pm$ 42,39	23,97 $\pm$ 31,71	0,705	58,8 $\pm$ 43,25	34,05 $\pm$ 37,84	0,258
IL-2	17714 $\pm$ 12285	13640 $\pm$ 5902	0,412	11816 $\pm$ 9052	11276 $\pm$ 10121	0,4108
IL-4	6923 $\pm$ 8034	7676 $\pm$ 7256	0,847	11013 $\pm$ 10922	11276 $\pm$ 10121	0,962
IL-5	3555 $\pm$ 3057	2521 $\pm$ 2960	0,503	1281 $\pm$ 890,7	1214 $\pm$ 465,8	0,861
IL-6	401 $\pm$ 181,1	1126 $\pm$ 1341	0,152	1580 $\pm$ 1940	1554 $\pm$ 2083	0,980
$\gamma$ IL-10	1634 $\pm$ 1203	1445 $\pm$ 1427	0,778	1689 $\pm$ 690,9	1161 $\pm$ 576,2	0,135
IL-17	4900 $\pm$ 6949	6154 $\pm$ 4997	0,685	8123 $\pm$ 11322	17317 $\pm$ 12326	0,156
IFN- $\gamma$	21154 $\pm$ 13790	32510 $\pm$ 23219	0,324	45759 $\pm$ 38982	49959 $\pm$ 66770	0,882
GM-CSF	7886 $\pm$ 4080	7126 $\pm$ 10184	0,855	7692 $\pm$ 4512	9169 $\pm$ 9763	0,707
TNF- $\alpha$	0	0		0	0	

La concentración está expresada en pg/ml y los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM.

MO: médula ósea; li: grupo li; liMOG: grupo liMOG (n=8)



**DISCUSIÓN**



Este trabajo se inició con la finalidad de averiguar qué tipo celular y qué mecanismos están implicados en la inducción de tolerancia inmunológica por parte de células de MO transducidas con un autoantígeno en un modelo de EAE. En un estudio anterior realizado en nuestro laboratorio demostramos que la infusión de células de MO transducidas con un autoantígeno (MOG<sub>40-55</sub>), tanto en un contexto parcialmente mieloablativo como en ausencia de mieloablación, inducía tolerancia antígeno-específica en el modelo de EAE en ratones C57BL/6J inmunizados con MOG<sub>40-55</sub> (Eixarch et al. 2009). En dicho estudio observamos que, en receptores sometidos a mieloablación subletal con busulfán, cuando la intervención se realizaba de manera preventiva, la inducción de quimerismo hematopoyético con células singénicas transducidas con el autoantígeno daba lugar a un elevado nivel de protección frente a la enfermedad. Además, cuando el abordaje era terapéutico, es decir, la intervención se realizaba cuando los animales ya presentaban signos clínicos de la enfermedad, se observaba una mejoría clínica significativa en los animales tratados con la MO transducida con el autoantígeno respecto a los tratados con la MO control. En el abordaje preventivo con mieloablación, los animales tratados con la MO presentaban injerto estable de las células transducidas (quimerismo molecular) en todos los órganos hematopoyéticos analizados (incluyendo el timo), lo que sugería que los mecanismos implicados en la protección de los animales frente al desarrollo de la enfermedad probablemente incluirían los de tolerancia central. Por el contrario, en el abordaje terapéutico con mieloablación, se observó quimerismo del donante pero no molecular (sólo injertaban las células no transducidas), motivo que nos llevó a pensar que en este caso los mecanismos que podían estar mediando la recuperación de los animales serían de tolerancia periférica. Al estudiar el patrón de citocinas secretadas al medio por los esplenocitos expuestos al autoantígeno se observó un aumento significativo de citocinas antiinflamatorias en el grupo tratado con células que expresaban el autoantígeno (liMOG) en comparación con el grupo control (li), concretamente se observó un aumento de IL-5 e IL-10 sugiriéndonos la posible participación de células reguladoras, nTreg o Tr1.

## **Discusión**

El hecho de que no fuese necesario que se produjera injerto o quimerismo molecular estable y la rápida recuperación observada en los ratones tratados, entre dos y cinco días después de la infusión de las células, nos hizo pensar que el efecto observado en los animales probablemente no estaba relacionado con células con capacidad de repoblación o de injerto a largo plazo, sino con otra u otras poblaciones celulares que se generaban en los cultivos de transducción de MO, y que necesariamente debían expresar el autoantígeno (dado que el efecto no se observaba en los animales control), y que probablemente estaría mediado por mecanismos de tolerancia periférica, que además actuarían de forma relativamente rápida.

Estas observaciones nos condujeron a reformular la hipótesis de trabajo, que inicialmente implicaba mecanismos de tolerancia principalmente central, asociados al quimerismo molecular estable a nivel tímico. Así, nos planteamos que podrían estar implicados mecanismos de tolerancia periférica y también la posibilidad de que otras poblaciones celulares diferentes a los progenitores hematopoyéticos participaran en el efecto terapéutico observado en el modelo de EAE. Para ello se realizaron varios análisis fenotípicos de la MO, al principio y al final de los cultivos de transducción, y observamos que al final del cultivo había un aumento de marcadores de células mieloides en comparación con la MO inicial, concretamente dos poblaciones, la CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low</sup> y la CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup>, que además de ser las dos poblaciones celulares mayoritarias, también representaban las poblaciones con mayor eficiencia de transducción. El fenotipo de estas dos poblaciones mieloides detectadas era compatible con el descrito para las MDSCs murinas CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high/low</sup> (Gabrilovich and Nagaraj 2009).

En ratones normales la población celular CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> representa un 20-30% del total de células de la MO (Gabrilovich and Nagaraj 2009), en nuestro caso el porcentaje de esta población en los donantes de MO era inferior al descrito, lo que quizás se podría atribuir al efecto del 5-FU, que había sido administrado a los ratones donantes cinco días antes de la obtención de las células de la MO con la finalidad de eliminar las células que están en ciclo celular, pero se ha descrito que este fármaco citostático también elimina

las MDSCs (Vincent et al. 2010). En los protocolos de transducción de la MO murina con vectores  $\gamma$ -retrovíricos, el 5-FU se administra a los ratones previamente con el doble objetivo de enriquecer la MO en progenitores inmaduros (al depleccionar de células en fase proliferativa) y para forzar a la entrada en ciclo de éstos, que en situación normal están mayoritariamente en estado de quiescencia, ya que este es un requisito indispensable para poder ser transducidos por dichos vectores (Rosendaal et al. 1979, Boswell et al. 1984, Bertoncetto et al. 1987, Wieder et al. 1991)

Las células mieloides CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> que se generan en nuestros cultivos de transducción reúnen la mayoría de los criterios fenotípicos, morfológicos y funcionales que definen a las MDSCs. Este tipo celular se compone de una población heterogénea de células más o menos inmaduras que expresan marcadores mieloides, incluyendo los dos subtipos principales, CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low</sup> y CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup> (Gabrilovich and Nagaraj 2009). En nuestros cultivos de transducción de MO, hemos demostrado por primera vez la generación o expansión de los dos subtipos principales de MDSCs mencionados así como la expresión de CD124, F4/80 y MHC-I, que define a las MDSCs (Youn et al. 2008). Además, las MDSCs generadas en los cultivos de transducción presentan bajos niveles de expresión de MHC-II. En humanos, no hay un consenso tan amplio como en el caso de las murinas, pero el fenotipo más común de las MDSCs está definido como CD14<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> que tiene expresión del marcador mieloides CD33 pero no expresan HLA-DR (molécula de MHC-II). Las MDSCs incluso se han identificado dentro de la población CD15<sup>+</sup>, en SP humana (Almand et al. 2001), en cambio para las MDSCs murinas se ha descrito una gran variabilidad en la expresión de moléculas de MHC-II (Nagaraj et al. 2012). A pesar de dicha variabilidad, se ha observado la expresión de MHC-II, conjuntamente con la de CD40L, está asociada a la activación de las MDSCs y que es necesaria para mediar en la generación de nTreg *in vivo* y para la inducción de tolerancia inmunológica (Pan et al. 2010). Yin y colaboradores demostraron la importancia de la expresión del MHC-II en las MDSCs, observaron que las MDSCs de ratones que no expresaban MHC-II tenían un 20% menos de capacidad de expandir las células nTreg en comparación con ratones normales y este efecto no se observaba en las MDSCs de ratones deficientes en moléculas de MHC-I, demostrando así la

## **Discusión**

importancia de la expresión de MHC-II en las MDSCs para la expansión de células nTreg y la inducción de tolerancia (Yin et al. 2010).

Una de las funciones que se han descrito en las MDSCs es la de mediar la inducción de tolerancia mediante la supresión de la proliferación de las células T. Se ha descrito que dicha supresión puede ser tanto no específica de antígeno como antígeno-específica (Nagaraj et al. 2010, Yin et al. 2010, Nagaraj and Gabrilovich 2012). En nuestro estudio previo observamos un efecto terapéutico sólo en los ratones con EAE que habían recibido células de MO transducidas con el autoantígeno (Eixarch et al. 2009), indicándonos que esta recuperación podría estar mediada por mecanismos antígeno-específicos y que esto requería de la presentación antigénica. Esto último lo podemos corroborar con el vector retroviral utilizado en nuestros estudios, el sistema utilizado ayuda a la presentación antigénica, la secuencia terapéutica utilizada se unió a la Ii, en la que sustituyó la secuencia correspondiente a la región CLIP por la secuencia que codificaba para el autoantígeno MOG<sub>40-55</sub>. Este sistema de vector retroviral ya demostró en el pasado ser capaz de presentar de forma eficiente el autoantígeno por la vía del MHC-II (Bischof et al. 2001). En el estudio del fenotipo de las MDSCs generadas en nuestros cultivos hemos demostrado que expresan las moléculas clave para ambas vías de presentación antigénica, MHC-I y MHC-II, ambas necesarias para la presentación antigénica a las células T CD8<sup>+</sup> y T CD4<sup>+</sup>, respectivamente. La expresión de MHC-II por las MDSCs es necesaria para inducir tolerancia de células T CD4<sup>+</sup> (Nagaraj and Gabrilovich 2012, Nagaraj et al. 2013). Por último, hemos observado que tanto las células de la MO como la subpoblación CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low</sup> transducidas con el autoantígeno inducen una elevada supresión de la proliferación de los esplenocitos obtenidos de animales con EAE en comparación con la mediada por sus controles. Estos resultados sugieren que la presentación antigénica vía MHC-II por parte de las MDSCs transducidas con el autoantígeno participa en el efecto tolerogénico sobre las células T y terapéutico en la enfermedad experimental. Respecto a la población CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup>, su actividad supresora era similar en las células transducidas con el autoantígeno y en las control. Una posible explicación de estos resultados podría ser la diferencia en los niveles de transducción que presentan ambos subtipos celulares, las células CD11b<sup>+</sup> Gr-

## Discusión

$1^{low}$  presentan unos niveles mayores de transducción en comparación con la subpoblación  $CD11b^+ Gr-1^{high}$ , probablemente asociada a una mayor expansión durante el cultivo. Mientras que la subpoblación  $CD11b^+ Gr-1^{low}$  aumentaba un promedio de cinco veces al final del cultivo la subpoblación  $CD11b^+ Gr-1^{high}$  únicamente lo hacía dos veces. Creemos que esta diferencia en la capacidad de proliferación de ambas subpoblaciones celulares es la responsable de que al final de cultivos las células  $CD11b^+ Gr-1^{low}$  se transdujeran el doble, de media, que la subpoblación  $CD11b^+ Gr-1^{high}$ . En los ensayos de supresión, cuando se hizo el cálculo de la ratio de células efectoras y células supresoras, se tuvo en cuenta la representación de cada una de las subpoblaciones mieloides dentro de la MO total y no del porcentaje de células transducidas, por razones prácticas, dato que se ha de tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados.

Una vez observado que en los cultivos de MO se estaban generando dos poblaciones mayoritarias de MDSCs, nos propusimos averiguar si esto era debido al uso de los medios condicionados (WEHI-3B, rico en IL-3, y BHK/MKL, rico en SCF) que utilizábamos en nuestros cultivos de MO. En los cultivos de transducción de células hematopoyéticas con vectores  $\gamma$ -retrovirales se utilizan combinaciones de citocinas que nos permiten mantener los progenitores inmaduros en cultivo a la vez que se induce su entrada en ciclo celular (para facilitar su transducción por los vectores), pero intentando evitar, en la medida de lo posible, su diferenciación. Con este fin, las citocinas más utilizadas son: mSCF, mIL-3, IL-6 (murina o humana), mIL-11, Tpo (murina o humana) y Flt3-L (murino o humano) (Haviernik et al. 2008). Algunas de estas citocinas se han descrito que están implicadas en la generación de MDSCs murinas *in vitro*, como el SCF (Pan et al. 2008) o en humanos la IL-6 (Lechner et al. 2010) y el Flt3-L (Lechner et al. 2011). Además de citocinas recombinantes, en los cultivos de transducción también se pueden utilizar medios condicionados que derivan de tumores o líneas celulares inmortalizadas y que también se ha descrito que pueden facilitar la generación de MDSCs (Xiang et al. 2009, Rodrigues et al. 2010). Tanto las células empaquetadoras de vectores retrovirales (HEK-293T) como las utilizadas como fuentes para generar sobrenadantes ricos en IL-3 y mSCF, entre otros (WEHI-3B y BHK/MKL), son en realidad líneas inmortalizadas o directamente derivadas de tumores y, por lo tanto, constituyen

## **Discusión**

otro factor adicional que podría contribuir a la generación de MDSCs en nuestros cultivos.

Para determinar si la generación de MDSCs que observábamos dependía del uso de los medios condicionados o no, se realizó un estudio comparativo entre el uso de medios condicionados y de diferentes combinaciones de citocinas recombinantes, sin que encontráramos diferencias significativas entre ambas condiciones, lo que nos permitió descartar la implicación de posibles factores presentes en los medios condicionados en la generación de MDSCs. Por otra parte, los resultados obtenidos indican que la IL-3 es una citocina importante en la generación de las MDSCs *in vitro* y nos descarta razonablemente la implicación de componentes no definidos que puedan estar presentes en los medios condicionados ya que la utilización de citocinas recombinantes nos ha dado resultados similares en el índice de expansión celular de nuestros cultivos y en el porcentaje de las diferentes subpoblaciones generadas. La IL-3 es una citocina implicada en la expansión de las MDSCs junto a otras citocinas o factores de crecimiento como IL-6, Tpo, Flt3-L, VEGF, GM-CSF, entre otros (Zhou et al. 2010, Condamine and Gabrilovich 2011). Pero se ha visto que por sí solas no pueden activar las MDSCs, para ello se requieren señales inflamatorias como el IFN- $\gamma$ , IL-13, la IL-4, TGF- $\beta$  o productos bacterianos como el LPS, capaces de activar factores de transcripción que a su vez inducen la expresión de moléculas implicadas en los mecanismos de supresión de las MDSCs, como la arginasa-1, la iNOS y la producción de ROS (Condamine and Gabrilovich 2011, Draghiciu et al. 2015).

Si comparamos la generación de MDSCs con la generación de otros tipos celulares, observamos que las condiciones necesarias para generar y activar las MDSCs son similares a las utilizadas para generar DCs. Si comparamos los protocolos de generación *in vitro* de ambos tipos celulares observamos que en los dos tipos celulares la IL-4 y el GM-CSF son necesarios para su diferenciación, y la necesidad de que sean activadas para generar su efecto supresor (Kalantari et al. 2013), aunque con algunas diferencias importantes, como que las DCs suelen generarse a partir de monocitos adherentes mientras que para generar las MDSCs no es necesario hacer una selección celular

previa, otra diferencia es el papel que realiza la IL-4 en cada uno de estos dos tipos celulares, en el caso de las DCs, la IL-4 juega un papel necesario en la generación de las DCs, en cambio en las MDSCs, se ha visto, como he comentado anteriormente, que su papel es activar su capacidad supresora. En la generación de DCs se sabe que es necesaria la presencia de GM-CSF, en el caso de las MDSCs no está del todo claro si es una citocina importante o no para su generación ya que se han publicado artículos con resultados contradictorios sobre la necesidad o no de utilizar GM-CSF en el cóctel de citoquinas para producirlas (Lechner et al. 2010, Zhou et al. 2010, Messmann et al. 2015). Si comparamos una población de DCs con características funcionales similares a las de las MDSCs, como son las tolDCs, en los protocolos *ex vivo* descritos, estas se caracterizan por perder la capacidad adherente antes de llegar a la activación, por lo que no necesitan ser activadas para producir IL-10 y TGF- $\beta$  y suprimir a las células Th17 (Fang et al. 2014). Estas diferencias en la generación de los dos tipos celulares también ayudan a comprender por qué las MDSCs tienen una base tan heterogénea y a poder diferenciarlas de las DCs y más concretamente de las tolDCs.

En nuestros experimentos, las células CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low</sup> presentaban niveles más elevados de actividad arginasa-1 y de iNOS, una vez estimuladas con IFN- $\gamma$  y LPS, y presentaban un mayor efecto supresor, en comparación con las CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup>. Sin embargo, sólo las células de la MO total transducidas con el autoantígeno han demostrado tener un efecto terapéutico en nuestro modelo de EAE ya que el efecto de las CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup> es demasiado débil para ser considerado relevante, al menos a las dosis utilizadas en nuestro modelo.

Los diferentes subtipos de MDSCs pueden utilizar diferentes mecanismos de supresión haciendo que su potencial tolerogénico también sea diferente. La supresión producida por las CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low</sup> murinas está mediada por la arginasa-1, el NO, y citocinas y no requiere de contacto célula-célula. En cambio, los mecanismos de supresión de las CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup> necesitan del contacto con las células T (Nagaraj et al. 2007, Youn and Gabrilovich 2010). El efecto terapéutico de las CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup> generadas en la transducción de MO con el vector liMOG es mucho menos potente que

## **Discusión**

el observado con la MO total, un fenómeno al que podrían contribuir distintos factores. El primero es que la unión del anticuerpo anti-Gr-1 utilizado para el aislamiento de las dos poblaciones de MDSCs, Gr-1<sup>high</sup> y Gr-1<sup>low</sup> o el propio proceso de separación haya afectado a la funcionalidad de la molécula reconocida por el citado anticuerpo, reduciendo la capacidad supresora o tolerogénica de las MDSCs murinas, tal y como se ha descrito previamente (Ribechini et al. 2009). Si este es el caso, nos parece un problema muy difícil de solucionar, ya que el anticuerpo es necesario para identificar y separar las diferentes subpoblaciones de MDSCs y las técnicas disponibles para la separación de la población de interés requieren de la utilización de anticuerpos monoclonales que nos permitan separar poblaciones celulares fenotípicamente definidas y distinguibles, como las subpoblaciones de MDSCs, en base al nivel de expresión de marcadores específicos.

Por otro lado, el efecto tolerogénico más potente que se observa con la MO total transducida podría requerir del efecto combinado de diferentes tipos celulares o poblaciones presentes en el cultivo de MO, incluyendo las MSCs, que podrían tener un efecto aditivo o sinérgico. Debido al gran potencial inmunomodulador que tienen las MSCs, no podemos excluir su posible contribución al efecto observado *in vivo* tras la infusión de MO total. Sin embargo, las MSCs son más minoritarias que las MDSCs y típicamente no expresan MHC-II, por lo que creemos que difícilmente pueden jugar algún papel crítico en la presentación antigénica del péptido MOG<sub>40-55</sub> unido a la Ii. En todos los experimentos realizados en este estudio, tanto *in vivo* como *in vitro*, se ha utilizado el número de células de cada subpoblación de MDSCs estimado en función del porcentaje que representan en la MO total. Sin embargo, en el caso de las MSCs no hemos podido obtener mediante separación celular por citometría de flujo el número de células necesario para poder realizar los experimentos siguiendo el criterio descrito, por lo que no hemos podido evaluar su funcionalidad *in vitro* ni su posible efecto tolerogénico *in vivo*, o si este es aditivo o sinérgico con el de las CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup>.

Finalmente, hemos observado que los ratones a los que habíamos inyectado células de MO total o de la población CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup> transducidas con el autoantígeno

presentaban un porcentaje más elevado de células nTreg (CD4<sup>+</sup> CD45RB<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>). El aumento de las células nTreg en los animales tratados con las CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup> transducidas con el autoantígeno corrobora lo que otros autores han descrito previamente, que las MDSCs pueden funcionar como APCs induciendo la generación de células nTreg *in vivo* (Yin et al. 2010). El hecho que este aumento sólo se observe en los animales tratados con el vector terapéutico, y no con el vector control, sugiere que la presentación del autoantígeno por vía de MHC-II es un requisito necesario para inducir este aumento de las nTreg y generar tolerancia, tal y como se ha discutido anteriormente (Yin et al. 2010).

En nuestro estudio previo habíamos observado un aumento de la producción de IL-5 e IL-10 en los esplenocitos de ratones tratados con la MO transducida con el autoantígeno y sugeríamos que el efecto terapéutico observado podía estar mediado por las células Tr1, otro tipo de células T reguladoras (Eixarch et al. 2009). En este trabajo hemos analizado con mayor precisión la población Tr1 (CD4<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> IL-4<sup>low</sup> IL-5<sup>+</sup>) en los diferentes grupos experimentales y no hemos observado diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos experimentales haciendo que no podamos confirmar su participación o la de otra población de células reguladoras en el efecto tolerogénico observado, pero sí que hemos mostrado que las nTreg son inducidas *in vivo* por la subpoblación CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup> transducida con el autoantígeno. Pan y colaboradores demostraron que el aumento de las células nTreg y la supresión de las células T en animales con tumores estaba mediado por la coexpresión de CD40 y MHC-II en la superficie de las MDSCs y que esta coexpresión requería de la presencia de IFN- $\gamma$ , es decir, de un ambiente inflamatorio (Pan et al. 2010).

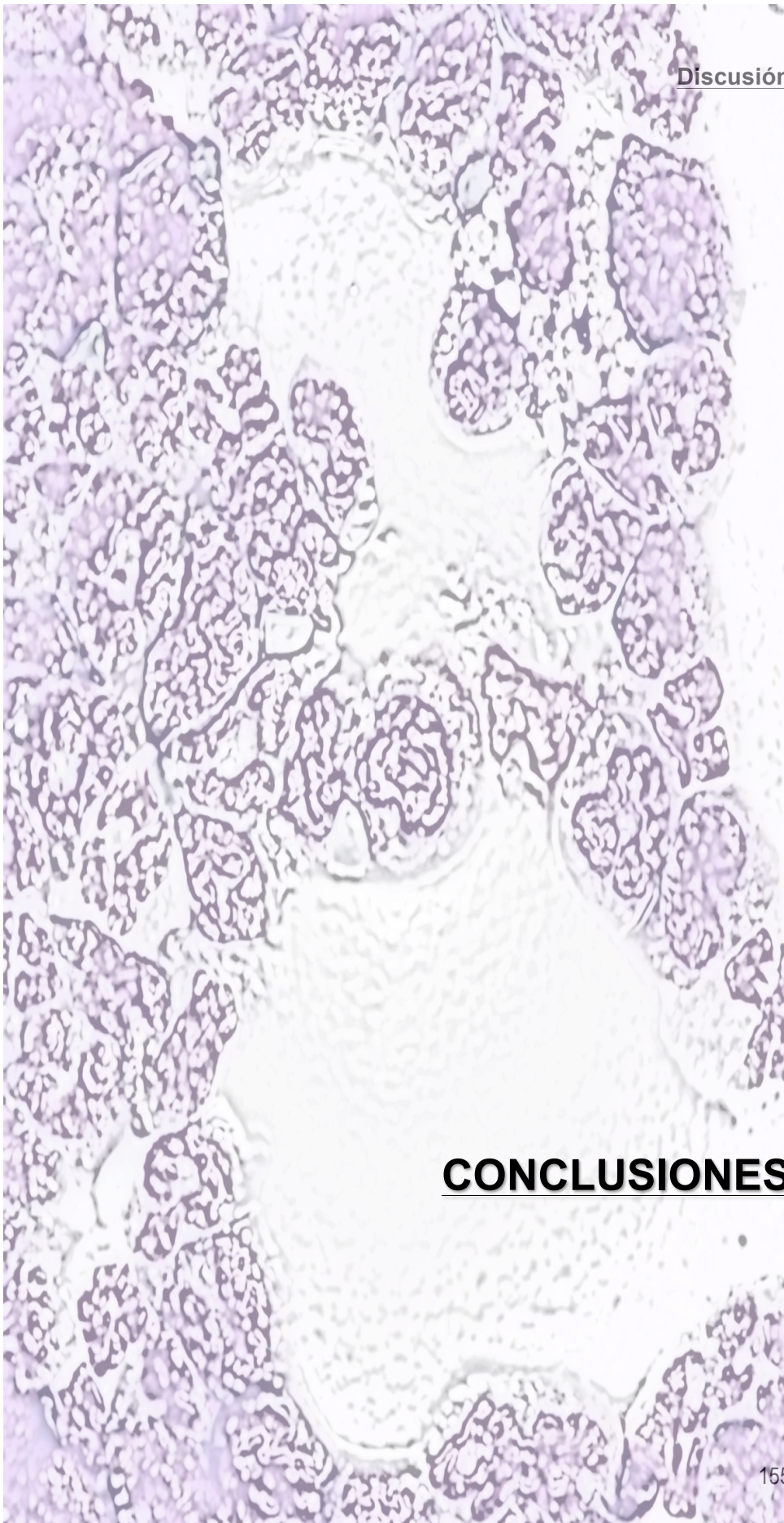
La idea de que se necesite un ambiente inflamatorio para que se produzca el efecto tolerogénico *in vivo* está apoyada por los resultados obtenidos en el abordaje preventivo donde la infusión de la MO transducida con el vector terapéutico días previos a la inducción de la EAE es capaz de generar una respuesta tolerogénica que se empieza a manifestar en la mayoría de los animales experimentales muy pocos días después de la inmunización. Estos resultados nos sugieren, por un lado, que probablemente las células

## **Discusión**

de MO son capaces de sobrevivir una vez infundidas durante muchos días en ausencia de mieloablación y, por otro, que para que las células de MO sean capaces de inducir tolerancia necesitan que haya un ambiente inflamatorio, necesario para que se den los mecanismos de supresión de las MDSCs y la generación de nTreg, entre otros mecanismos, tal y como hemos comentado anteriormente.

En distintas patologías (enfermedades oncológicas e infecciones crónicas) donde hay un ambiente inflamatorio de base, se ha demostrado no sólo que las MDSCs son capaces de inducir un aumento de nTreg sino que además estas dos poblaciones interactúan para suprimir la respuesta de células T (Kalathil et al. 2013, Kondo and Shimosegawa 2015). Este efecto cooperativo se podría extrapolar a lo que observamos en la aproximación terapéutica, donde las MDSCs generarían la respuesta inicial pero sería la interacción de estos dos tipos celulares la que produciría el efecto tolerogénico que observamos al final del seguimiento clínico de los animales.

En resumen, en este estudio demostramos por primera vez que en los cultivos de transducción de células de MO murina con vectores retrovíricos se generan MDSCs de los dos subtipos descritos (granulocítico y monocítico) y que tienen un efecto inmunosupresor *in vitro*. Además, en el modelo de EAE, la infusión de estas células podría inducir tolerancia inmunológica dependiente de la expresión del autoantígeno codificado por el transgén, si bien los resultados obtenidos en este sentido no son aún concluyentes. Este efecto potencial tiene un enorme interés clínico para inducir tolerancia antígeno-específica. Estos resultados presentan la transducción de MDSCs *ex vivo* con autoantígenos como una nueva herramienta para inducir tolerancia y auguran un gran potencial como vehículo celular en el tratamiento de enfermedades autoinmunes.



**CONCLUSIONES**

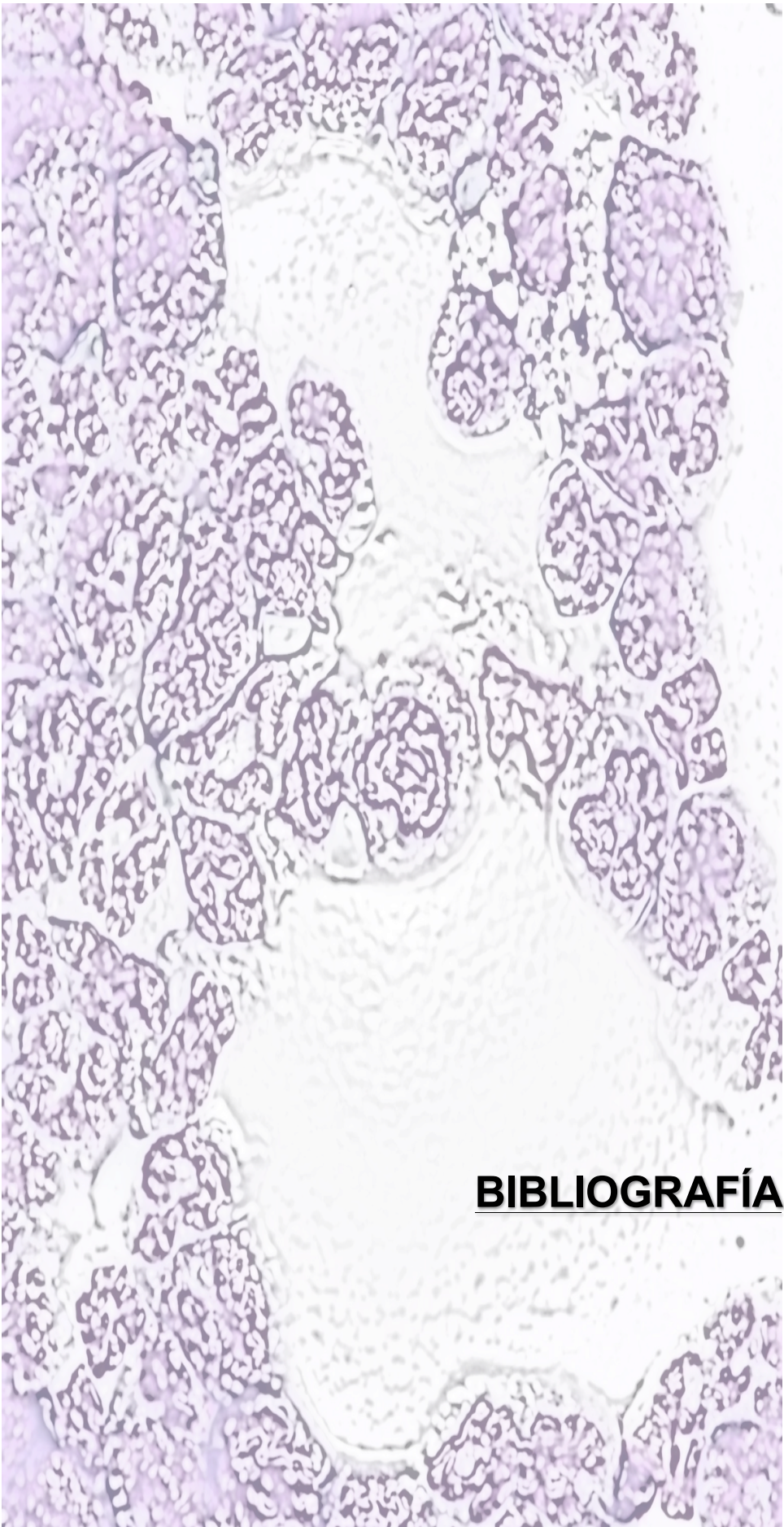


## Conclusiones

1. En los protocolos de transducción de MO con vectores  $\gamma$ -retrovirales se generan tres poblaciones celulares mayoritarias (CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup>, CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low</sup> y Lin<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup>), que además son las que presentan la mayor eficiencia de transducción.
2. Los protocolos estándares de transducción de MO generan MDSCs con capacidad inmunomoduladora antígeno-específica.
3. La población no hematopoyética (Lin<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup>) expresa marcadores fenotípicos de MSCs: CD29, CD44, CD90, CD105, y son MHC-I<sup>low</sup> y MHC-II<sup>-</sup>.
4. La población CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low</sup> tiene capacidad de suprimir la proliferación de las células T CD4<sup>+</sup> *in vitro*.
5. La infusión de MO total en un abordaje preventivo, no previenen el inicio de la EAE pero si induce una mejora clínica hasta su recuperación en los animales tratados
6. La infusión de MO total, así como de las células CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup> transducidas con el autoantígeno mejoran la progresión clínica de la EAE y están asociadas a un aumento de la población de nTreg en los bazo de los animales con EAE tratados.
7. Las células CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup> transducidas con el autoantígeno por sí solas no generan el mismo nivel de tolerancia inmunológica que la MO total sugiriendo que el efecto de esta podría ser debido a un efecto sinérgico de las poblaciones celulares que la forman, o bien que las dosis de MDSCs utilizadas en este estudio son insuficientes para conseguir el efecto terapéutico deseado.
8. La IL-3 juega un papel importante en la generación *in vitro* de las MDSCs.

## **Conclusiones**

9. La presencia de un ambiente pro-inflamatorio es necesario para la activación del efecto supresor de las MDSCs.



## **BIBLIOGRAFÍA**



**A**

Acha-Orbea, H., et al. (1988). "Limited heterogeneity of T cell receptors from lymphocytes mediating autoimmune encephalomyelitis allows specific immune intervention." Cell **54**(2): 263-273.

Aggarwal, S., et al. (2003). "Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17." J Biol Chem **278**(3): 1910-1914.

Aiuti, A. and M. G. Roncarolo (2009). "Ten years of gene therapy for primary immune deficiencies." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 682-689.

Aiuti, A., et al. (2002). "Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning." Science **296**(5577): 2410-2413.

Aktas, O., et al. (2010). "Fingolimod is a potential novel therapy for multiple sclerosis." Nat Rev Neurol **6**(7): 373-382.

Alexander, B. L., et al. (2007). "Progress and prospects: gene therapy clinical trials (part 1)." Gene Ther **14**(20): 1439-1447.

Almand, B., et al. (2001). "Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer." J Immunol **166**(1): 678-689.

Appleman, L. J. and V. A. Boussiotis (2003). "T cell anergy and costimulation." Immunol Rev **192**: 161-180.

Arai, F., et al. (2005). "Regulation of hematopoiesis and its interaction with stem cell niches." Int J Hematol **82**(5): 371-376.

**B**

Bachar-Lustig, E., et al. (1998). "Tolerance induction by megadose stem cell transplants: synergism between SCA-1+ Lin- cells and nonalloreactive T cells." Transplant Proc **30**(8): 4007-4008.

Bagley, J., et al. (2002). "Establishing immunological tolerance through the induction of molecular chimerism." Front Biosci **7**: d1331-1337.

Bainbridge, J. W., et al. (2008). "Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis." N Engl J Med **358**(21): 2231-2239.

Barczyk, A., et al. (2003). "Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine." Respir Med **97**(6): 726-733.

## **Bibliografia**

Barquinero, J., et al. (2000). "Efficient transduction of human hematopoietic repopulating cells generating stable engraftment of transgene-expressing cells in NOD/SCID mice." Blood **95**(10): 3085-3093.

Barry, F. P. and J. M. Murphy (2004). "Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization." Int J Biochem Cell Biol **36**(4): 568-584.

Berger, T., et al. (2003). "Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event." N Engl J Med **349**(2): 139-145.

Bertoncello, I., et al. (1987). "Increased Qa-m7 antigen expression is characteristic of primitive hemopoietic progenitors in regenerating marrow." J Immunol **139**(4): 1096-1103.

Billingham, R. E., et al. (1953). "Actively acquired tolerance of foreign cells." Nature **172**(4379): 603-606.

Bischof, F., et al. (2001). "Specific treatment of autoimmunity with recombinant invariant chains in which CLIP is replaced by self-epitopes." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(21): 12168-12173.

Blaese, R. M., et al. (1993). "Treatment of severe combined immunodeficiency disease (SCID) due to adenosine deaminase deficiency with CD34+ selected autologous peripheral blood cells transduced with a human ADA gene. Amendment to clinical research project, Project 90-C-195, January 10, 1992." Hum Gene Ther **4**(4): 521-527.

Blaese, R. M., et al. (1995). "T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years." Science **270**(5235): 475-480.

Bordignon, C., et al. (1995). "Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA- immunodeficient patients." Science **270**(5235): 470-475.

Boswell, H. S., et al. (1984). "Thy-1 antigen expression by murine high-proliferative capacity hematopoietic progenitor cells. I. Relation between sensitivity to depletion by Thy-1 antibody and stem cell generation potential." J Immunol **133**(6): 2940-2949.

Boztug, K., et al. (2010). "Stem-cell gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome." N Engl J Med **363**(20): 1918-1927.

Braun, C. J., et al. (2014). "Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome--long-term efficacy and genotoxicity." Sci Transl Med **6**(227): 227ra233.

Bubnic, S. J., et al. (2005). "Donor hematopoietic cells from transgenic mice that express GFP are immunogenic in immunocompetent recipients." Hematology **10**(4): 289-295.

**C**

Carstens, C., et al. (2000). "Invariant chains with the class II binding site replaced by a sequence from influenza virus matrix protein constrain low-affinity sequences to MHC II presentation." Int Immunol **12**(11): 1561-1568.

Cavazzana-Calvo, M., et al. (2000). "Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease." Science **288**(5466): 669-672.

Chamberlain, G., et al. (2007). "Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing." Stem Cells **25**(11): 2739-2749.

Champlin, R., et al. (2000). "Harnessing graft-versus-malignancy: non-myeloablative preparative regimens for allogeneic haematopoietic transplantation, an evolving strategy for adoptive immunotherapy." Br J Haematol **111**(1): 18-29.

Chinen, J. and J. M. Puck (2004). "Successes and risks of gene therapy in primary immunodeficiencies." J Allergy Clin Immunol **113**(4): 595-603; quiz 604.

Chotinantakul, K. and W. Leeansaksiri (2012). "Hematopoietic stem cell development, niches, and signaling pathways." Bone Marrow Res **2012**: 270425.

Comabella, M., et al. (2010). "Targeting dendritic cells to treat multiple sclerosis." Nat Rev Neurol **6**(9): 499-507.

Condamine, T. and D. I. Gabrilovich (2011). "Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function." Trends Immunol **32**(1): 19-25.

Congdon, K. L. and T. Reya (2008). "Divide and conquer: how asymmetric division shapes cell fate in the hematopoietic system." Curr Opin Immunol **20**(3): 302-307.

Corraliza, I. M., et al. (1994). "Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod." J Immunol Methods **174**(1-2): 231-235.

Correale, J., et al. (2008). "Vaccines for multiple sclerosis: progress to date." CNS Drugs **22**(3): 175-198.

Cresswell, P. (1994). "Assembly, transport, and function of MHC class II molecules." Annu Rev Immunol **12**: 259-293.

Cua, D. J., et al. (2003). "Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain." Nature **421**(6924): 744-748.

## **Bibliografia**

### **D**

Dahlman, I., et al. (1999). "Genome-wide linkage analysis of chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat identifies a major susceptibility locus on chromosome 9." J Immunol **162**(5): 2581-2588.

Dave, U. P., et al. (2004). "Gene therapy insertional mutagenesis insights." Science **303**(5656): 333.

De Palma, M., et al. (2005). "Promoter trapping reveals significant differences in integration site selection between MLV and HIV vectors in primary hematopoietic cells." Blood **105**(6): 2307-2315.

Ding, A. H., et al. (1988). "Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production." J Immunol **141**(7): 2407-2412.

Draghiciu, O., et al. (2015). "Myeloid derived suppressor cells-An overview of combat strategies to increase immunotherapy efficacy." Oncoimmunology **4**(1): e954829.

Drujon, L., et al. (2014). "Evaluation of the therapeutic potential of bone marrow-derived myeloid suppressor cell (MDSC) adoptive transfer in mouse models of autoimmunity and allograft rejection." PLoS One **9**(6): e100013.

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

### **E**

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

Eixarch, H., et al. (2009). "Transgene expression levels determine the immunogenicity of transduced hematopoietic grafts in partially myeloablated mice." Mol Ther **17**(11): 1904-1909.

Espejo, C., et al. (2001). "Differential expression of metallothioneins in the CNS of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis." Neuroscience **105**(4): 1055-1065.

**F**

Fang, Z., et al. (2014). "Characteristics of immunogenic and tolerogenic dendritic cells within the arterial wall in atherosclerosis and in vitro." Int J Clin Exp Med **7**(12): 4846-4856.

Fischer, A., et al. (2011). "Gene therapy for primary adaptive immune deficiencies." J Allergy Clin Immunol **127**(6): 1356-1359.

Friedenstein, A. J., et al. (1966). "Osteogenesis in transplants of bone marrow cells." J Embryol Exp Morphol **16**(3): 381-390.

Friedmann, T. (1992). "A brief history of gene therapy." Nat Genet **2**(2): 93-98.

Fujino, S., et al. (2003). "Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease." Gut **52**(1): 65-70.

**G**

Gabrilovich, D. I. and S. Nagaraj (2009). "Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system." Nat Rev Immunol **9**(3): 162-174.

Gabrilovich, D. I., et al. (2012). "Coordinated regulation of myeloid cells by tumours." Nat Rev Immunol **12**(4): 253-268.

Gaspar, H. B., et al. (2004). "Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector." Lancet **364**(9452): 2181-2187.

Genain, C. P., et al. (1999). "Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis." Nat Med **5**(2): 170-175.

Gershon, R. K. and K. Kondo (1970). "Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes." Immunology **18**(5): 723-737.

Gharibi, T., et al. (2015). "Immunomodulatory characteristics of mesenchymal stem cells and their role in the treatment of multiple sclerosis." Cell Immunol **293**(2): 113-121.

Glenn, J. D. and K. A. Whartenby (2014). "Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy." World J Stem Cells **6**(5): 526-539.

Groux, H., et al. (1997). "A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis." Nature **389**(6652): 737-742.

## **Bibliografia**

Gunthart, M. and M. Kearns-Jonker (2007). "Gene therapy for the induction of chimerism and transplant tolerance." Curr Gene Ther **7**(6): 411-420.

Gupta, S. K., et al. (2015). "Viral genes as oncolytic agents for cancer therapy." Cell Mol Life Sci **72**(6): 1073-1094.

## **H**

Hacein-Bey-Abina, S., et al. (2002). "Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy." N Engl J Med **346**(16): 1185-1193.

Hacein-Bey-Abina, S., et al. (2014). "A modified gamma-retrovirus vector for X-linked severe combined immunodeficiency." N Engl J Med **371**(15): 1407-1417.

Hacein-Bey-Abina, S., et al. (2003). "LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1." Science **302**(5644): 415-419.

Hartung, H. P., et al. (2002). "Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial." Lancet **360**(9350): 2018-2025.

Haviernik, P., et al. (2008). "Retroviral transduction of murine hematopoietic stem cells." Methods Mol Biol **430**: 229-241.

Herrmann, M. M., et al. (2005). "Tolerance induction by bone marrow transplantation in a multiple sclerosis model." Blood **106**(5): 1875-1883.

Hildinger, M., et al. (1999). "Bicistronic retroviral vectors for combining myelo-protection with cell-surface marking." Gene Ther **6**(7): 1222-1230.

Hirota, K., et al. (2007). "Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model." J Exp Med **204**(12): 2803-2812.

Holz, A., et al. (2000). "Myelin-associated oligodendrocytic basic protein: identification of an encephalitogenic epitope and association with multiple sclerosis." J Immunol **164**(2): 1103-1109.

Hori, S., et al. (2003). "Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells." Adv Immunol **81**: 331-371.

## **J**

Johnson, K. P., et al. (1995). "Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind

placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group." Neurology **45**(7): 1268-1276.

## **K**

Kabat, E. A., et al. (1946). "Rapid Production of Acute Disseminated Encephalomyelitis in Rhesus Monkeys by Injection of Brain Tissue With Adjuvants." Science **104**(2703): 362-363.

Kabat, E. A., et al. (1949). "Studies on acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in rhesus monkeys; disseminated encephalomyelitis produced in monkeys with their own brain tissue." J Exp Med **89**(4): 395-398.

Kalantari, T., et al. (2013). "Generation of large numbers of highly purified dendritic cells from bone marrow progenitor cells after co-culture with syngeneic murine splenocytes." Exp Mol Pathol **94**(2): 336-342.

Kalathil, S., et al. (2013). "Higher frequencies of GARP(+)/CTLA-4(+)/Foxp3(+) T regulatory cells and myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients are associated with impaired T-cell functionality." Cancer Res **73**(8): 2435-2444.

Kantoff, P. W., et al. (1987). "Expression of human adenosine deaminase in nonhuman primates after retrovirus-mediated gene transfer." J Exp Med **166**(1): 219-234.

Kantoff, P. W., et al. (1986). "Correction of adenosine deaminase deficiency in cultured human T and B cells by retrovirus-mediated gene transfer." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(17): 6563-6567.

Kavanaugh, M. P., et al. (1994). "Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(15): 7071-7075.

Kaye, J. F., et al. (2000). "The central nervous system-specific myelin oligodendrocytic basic protein (MOBP) is encephalitogenic and a potential target antigen in multiple sclerosis (MS)." J Neuroimmunol **102**(2): 189-198.

Kebir, H., et al. (2009). "Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis." Ann Neurol **66**(3): 390-402.

Kebir, H., et al. (2007). "Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation." Nat Med **13**(10): 1173-1175.

Kerlero de Rosbo, N., et al. (1985). "Concomitant detection of changes in myelin basic protein and permeability of blood-spinal cord barrier in acute experimental autoimmune encephalomyelitis by electroimmunoblotting." J Neuroimmunol **9**(6): 349-361.

## **Bibliografia**

Khan, F., et al. (2004). "Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme." Bone Marrow Transplant **34**(1): 1-12.

Kiel, M. J., et al. (2005). "SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells." Cell **121**(7): 1109-1121.

Kiem, H. P., et al. (1997). "Gene transfer into marrow repopulating cells: comparison between amphotropic and gibbon ape leukemia virus pseudotyped retroviral vectors in a competitive repopulation assay in baboons." Blood **90**(11): 4638-4645.

Kohn, D. B., et al. (1995). "Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency." Nat Med **1**(10): 1017-1023.

Komiyama, Y., et al. (2006). "IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **177**(1): 566-573.

Kondo, Y. and T. Shimosegawa (2015). "Significant roles of regulatory T cells and myeloid derived suppressor cells in hepatitis B virus persistent infection and hepatitis B virus-related HCCs." Int J Mol Sci **16**(2): 3307-3322.

Korn, T., et al. (2009). "IL-17 and Th17 Cells." Annu Rev Immunol **27**: 485-517.

Kornek, B., et al. (2000). "Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions." Am J Pathol **157**(1): 267-276.

Kwok, W. W., et al. (1986). "Retroviral transfer of genes into canine hemopoietic progenitor cells in culture: a model for human gene therapy." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(12): 4552-4555.

## **L**

Lang, F. F., et al. (2003). "Phase I trial of adenovirus-mediated p53 gene therapy for recurrent glioma: biological and clinical results." J Clin Oncol **21**(13): 2508-2518.

Lange, C., et al. (2009). "Differential modulation of CNS-specific effector and regulatory T cells during tolerance induction by recombinant invariant chains in vivo." Brain Behav Immun **23**(6): 861-867.

Langrish, C. L., et al. (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." J Exp Med **201**(2): 233-240.

Lassmann, H., et al. (1980). "Structural variability of demyelinating lesions in different models of subacute and chronic experimental allergic encephalomyelitis." Acta Neuropathol **51**(3): 191-201.

Lassmann, H. and H. M. Wisniewski (1979). "Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: clinicopathological comparison with multiple sclerosis." Arch Neurol **36**(8): 490-497.

Latta-Mahieu, M., et al. (2002). "Gene transfer of a chimeric trans-activator is immunogenic and results in short-lived transgene expression." Hum Gene Ther **13**(13): 1611-1620.

Lechner, M. G., et al. (2010). "Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells." J Immunol **185**(4): 2273-2284.

Lechner, M. G., et al. (2011). "Functional characterization of human Cd33+ and Cd11b+ myeloid-derived suppressor cell subsets induced from peripheral blood mononuclear cells co-cultured with a diverse set of human tumor cell lines." J Transl Med **9**: 90.

Lee, J. C., et al. (1982). "Constitutive production of a unique lymphokine (IL 3) by the WEHI-3 cell line." J Immunol **128**(6): 2393-2398.

Lenz, D. C., et al. (1999). "Strain variation in autoimmunity: attempted tolerization of DA rats results in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **163**(4): 1763-1768.

Liston, A., et al. (2005). "Genetic lesions in T-cell tolerance and thresholds for autoimmunity." Immunol Rev **204**: 87-101.

Lublin, F. D. and S. C. Reingold (1996). "Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis." Neurology **46**(4): 907-911.

Lublin, F. D., et al. (2014). "Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions." Neurology **83**(3): 278-286.

Lutzko, C., et al. (1999). "Gene therapy for canine alpha-L-iduronidase deficiency: in utero adoptive transfer of genetically corrected hematopoietic progenitors results in engraftment but not amelioration of disease." Hum Gene Ther **10**(9): 1521-1532.

## **Bibliografia**

### **M**

Maatta, J. A., et al. (1998). "Encephalitogenicity of myelin-associated oligodendrocytic basic protein and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase for BALB/c and SJL mice." Immunology **95**(3): 383-388.

Majeti, R., et al. (2007). "Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood." Cell Stem Cell **1**(6): 635-645.

Mansilla, M. J., et al. (2015). "Beneficial effect of tolerogenic dendritic cells pulsed with MOG autoantigen in experimental autoimmune encephalomyelitis." CNS Neurosci Ther **21**(3): 222-230.

Markowitz, C. E. (2007). "Interferon-beta: mechanism of action and dosing issues." Neurology **68**(24 Suppl 4): S8-11.

Matusevicius, D., et al. (1999). "Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis." Mult Scler **5**(2): 101-104.

McCann, S. R., et al. (2005). "Hemopoietic chimerism following stem cell transplantation." Transfus Apher Sci **32**(1): 55-61.

Mendel, I., et al. (1998). "Interleukin-6 functions in autoimmune encephalomyelitis: a study in gene-targeted mice." Eur J Immunol **28**(5): 1727-1737.

Mendel, I., et al. (1995). "A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells." Eur J Immunol **25**(7): 1951-1959.

Messmann, J. J., et al. (2015). "In vitro-generated MDSCs prevent murine GVHD by inducing type 2 T cells without disabling antitumor cytotoxicity." Blood **126**(9): 1138-1148.

Miller, A., et al. (1992). "Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(1): 421-425.

Miller, A. D. (1996). "Cell-surface receptors for retroviruses and implications for gene transfer." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(21): 11407-11413.

Miller, A. D. and F. Chen (1996). "Retrovirus packaging cells based on 10A1 murine leukemia virus for production of vectors that use multiple receptors for cell entry." J Virol **70**(8): 5564-5571.

Miller, D. H., et al. (2012). "Clinically isolated syndromes." Lancet Neurol **11**(2): 157-169.

Miller, D. M., et al. (2000). "A meta-analysis of methylprednisolone in recovery from multiple sclerosis exacerbations." Mult Scler **6**(4): 267-273.

Mokhtarian, F., et al. (1984). "Adoptive transfer of myelin basic protein-sensitized T cells produces chronic relapsing demyelinating disease in mice." Nature **309**(5966): 356-358.

Moline-Velazquez, V., et al. (2011). "Myeloid-derived suppressor cells limit the inflammation by promoting T lymphocyte apoptosis in the spinal cord of a murine model of multiple sclerosis." Brain Pathol **21**(6): 678-691.

Montes, M., et al. (2009). "Oligoclonal myelin-reactive T-cell infiltrates derived from multiple sclerosis lesions are enriched in Th17 cells." Clin Immunol **130**(2): 133-144.

Moreno, B., et al. (2012). "[Guidelines on the appropriate use of animal models for developing therapies in multiple sclerosis]." Rev Neurol **54**(2): 114-124.

Morris-Downes, M. M., et al. (2002). "Encephalitogenic and immunogenic potential of myelin-associated glycoprotein (MAG), oligodendrocyte-specific glycoprotein (OSP) and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) in ABH and SJL mice." J Neuroimmunol **122**(1-2): 20-33.

## **N**

Muraro, P. A., et al. (2005). "Thymic output generates a new and diverse TCR repertoire after autologous stem cell transplantation in multiple sclerosis patients." J Exp Med **201**(5): 805-816.

Murphy, C. A., et al. (2003). "Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation." J Exp Med **198**(12): 1951-1957.

Nagaraj, S. and D. I. Gabrilovich (2012). "Regulation of suppressive function of myeloid-derived suppressor cells by CD4+ T cells." Semin Cancer Biol **22**(4): 282-288.

Nagaraj, S., et al. (2007). "Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer." Nat Med **13**(7): 828-835.

Nagaraj, S., et al. (2012). "Antigen-specific CD4(+) T cells regulate function of myeloid-derived suppressor cells in cancer via retrograde MHC class II signaling." Cancer Res **72**(4): 928-938.

Nagaraj, S., et al. (2010). "Mechanism of T cell tolerance induced by myeloid-derived suppressor cells." J Immunol **184**(6): 3106-3116.

## **Bibliografia**

Nagaraj, S., et al. (2013). "Reciprocal relationship between myeloid-derived suppressor cells and T cells." J Immunol **191**(1): 17-23.

Nathwani, A. C., et al. (2011). "Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B." N Engl J Med **365**(25): 2357-2365.

Nayak, S. and R. W. Herzog (2010). "Progress and prospects: immune responses to viral vectors." Gene Ther **17**(3): 295-304.

Neefjes, J. J., et al. (1990). "The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route." Cell **61**(1): 171-183.

Neuhaus, O., et al. (2000). "Multiple sclerosis: comparison of copolymer-1- reactive T cell lines from treated and untreated subjects reveals cytokine shift from T helper 1 to T helper 2 cells." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(13): 7452-7457.

Nicholson, L. B., et al. (1995). "An altered peptide ligand mediates immune deviation and prevents autoimmune encephalomyelitis." Immunity **3**(4): 397-405.

Nienhuis, A. W., et al. (2006). "Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells." Mol Ther **13**(6): 1031-1049.

Noel, D., et al. (2007). "Multipotent mesenchymal stromal cells and immune tolerance." Leuk Lymphoma **48**(7): 1283-1289.

## **O**

Oksenberg, J. R. and S. E. Baranzini (2010). "Multiple sclerosis genetics--is the glass half full, or half empty?" Nat Rev Neurol **6**(8): 429-437.

Okuda, Y., et al. (1999). "IL-6 plays a crucial role in the induction phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein 35-55 induced experimental autoimmune encephalomyelitis." J Neuroimmunol **101**(2): 188-196.

Osterman, J. V., et al. (1970). "DNA and gene therapy: uncoating of polyoma pseudovirus in mouse embryo cells." Proc Natl Acad Sci U S A **67**(1): 37-40.

Ostrand-Rosenberg, S. and P. Sinha (2009). "Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer." J Immunol **182**(8): 4499-4506.

Ott, M. G., et al. (2006). "Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1." Nat Med **12**(4): 401-409.

**P**

Palu, G., et al. (2000). "Progress with retroviral gene vectors." Rev Med Virol **10**(3): 185-202.

Pan, P. Y., et al. (2010). "Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer." Cancer Res **70**(1): 99-108.

Pan, P. Y., et al. (2008). "Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem-cell factor function." Blood **111**(1): 219-228.

Paterson, P. Y. (1960). "Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells." J Exp Med **111**: 119-136.

Paty, D. W. and D. K. Li (1993). "Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group." Neurology **43**(4): 662-667.

Pender, M. P. (1987). "Demyelination and neurological signs in experimental allergic encephalomyelitis." J Neuroimmunol **15**(1): 11-24.

Pettinelli, C. B. and D. E. McFarlin (1981). "Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes." J Immunol **127**(4): 1420-1423.

Polman, C. H., et al. (1986). "Immunohistological analysis of macrophages in the central nervous system of Lewis rats with acute experimental allergic encephalomyelitis." J Neuroimmunol **11**(3): 215-222.

Polman, C. H., et al. (1988). "Low-dose cyclosporin A induces relapsing remitting experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat." J Neuroimmunol **17**(3): 209-216.

**R**

Rachamim, N., et al. (1998). "Tolerance induction by "megadose" hematopoietic transplants: donor-type human CD34 stem cells induce potent specific reduction of host anti-donor cytotoxic T lymphocyte precursors in mixed lymphocyte culture." Transplantation **65**(10): 1386-1393.

Raine, C. S. and A. H. Cross (1989). "Axonal dystrophy as a consequence of long-term demyelination." Lab Invest **60**(5): 714-725.

## **Bibliografia**

Raine, C. S., et al. (1984). "Adoptively transferred chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. Neuropathologic analysis." Lab Invest **51**(5): 534-546.

Ribechini, E., et al. (2009). "Gr-1 antibody induces STAT signaling, macrophage marker expression and abrogation of myeloid-derived suppressor cell activity in BM cells." Eur J Immunol **39**(12): 3538-3551.

Rivers, T. M., et al. (1933). "Observations on Attempts to Produce Acute Disseminated Encephalomyelitis in Monkeys." J Exp Med **58**(1): 39-53.

Roche, P. A. and P. Cresswell (1991). "Proteolysis of the class II-associated invariant chain generates a peptide binding site in intracellular HLA-DR molecules." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(8): 3150-3154.

Rodrigues, J. C., et al. (2010). "Normal human monocytes exposed to glioma cells acquire myeloid-derived suppressor cell-like properties." Neuro Oncol **12**(4): 351-365.

Rodriguez, P. C., et al. (2007). "L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression." Blood **109**(4): 1568-1573.

Rodriguez, P. C., et al. (2004). "Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses." Cancer Res **64**(16): 5839-5849.

Rommer, P., et al. (2013). "Monoclonal Antibodies in Treatment of Multiple Sclerosis." Clin Exp Immunol.

Rosendaal, M., et al. (1979). "Organization of haemopoietic stem cells: the generation-age hypothesis." Cell Tissue Kinet **12**(1): 17-29.

Roth, M. P., et al. (1999). "A genome-wide search identifies two susceptibility loci for experimental autoimmune encephalomyelitis on rat chromosomes 4 and 10." J Immunol **162**(4): 1917-1922.

Rouvier, E., et al. (1993). "CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene." J Immunol **150**(12): 5445-5456.

Rudick, R., et al. (2013). "Natalizumab: bench to bedside and beyond." JAMA Neurol **70**(2): 172-182.

**S**

Sakaguchi, M., et al. (1995). "Characterization of CD4+ T helper cells in patients with Kawasaki disease (KD): preferential production of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) by V beta 2- or V beta 8- CD4+ T helper cells." Clin Exp Immunol **99**(2): 276-282.

Scheffold, A., et al. (2007). "Competition for cytokines: T(reg) cells take all." Nat Immunol **8**(12): 1285-1287.

Schippling, S., et al. (2008). "Stem cell transplantation in multiple sclerosis." J Neurol **255 Suppl 6**: 43-47.

Seita, J. and I. L. Weissman (2010). "Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation." Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med **2**(6): 640-653.

Simmons, R. D., et al. (1982). "Experimental autoimmune encephalomyelitis. An anatomically-based explanation of clinical progression in rodents." J Neuroimmunol **3**(4): 307-318.

Stepaniak, J. A., et al. (1997). "Interstrain variability of autoimmune encephalomyelitis in rats: multiple encephalitogenic myelin basic protein epitopes for DA rats." J Neuroimmunol **78**(1-2): 79-85.

Stevens, D. B., et al. (1999). "Oligodendrocyte-specific protein peptides induce experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice." J Immunol **162**(12): 7501-7509.

Stewart, F. M., et al. (1993). "Long-term engraftment of normal and post-5-fluorouracil murine marrow into normal nonmyeloablated mice." Blood **81**(10): 2566-2571.

Sun, B. and Y. Zhang (2014). "Overview of orchestration of CD4+ T cell subsets in immune responses." Adv Exp Med Biol **841**: 1-13.

Sun, D., et al. (2001). "Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice." J Immunol **166**(12): 7579-7587.

**T**

Taubert, R., et al. (2007). "Highly variable expression of tissue-restricted self-antigens in human thymus: implications for self-tolerance and autoimmunity." Eur J Immunol **37**(3): 838-848.

Teh, B. S., et al. (2004). "Phase I-II trial evaluating combined intensity-modulated radiotherapy and in situ gene therapy with or without hormonal therapy in treatment of

## **Bibliografia**

prostate cancer-interim report on PSA response and biopsy data." Int J Radiat Oncol Biol Phys **58**(5): 1520-1529.

Tsaknaridis, L., et al. (2003). "Functional assay for human CD4+CD25+ Treg cells reveals an age-dependent loss of suppressive activity." J Neurosci Res **74**(2): 296-308.

Tzartos, J. S., et al. (2008). "Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis." Am J Pathol **172**(1): 146-155.

## **V**

van der Veen, R. C., et al. (1989). "The adoptive transfer of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis with lymph node cells sensitized to myelin proteolipid protein." J Neuroimmunol **21**(2-3): 183-191.

van Hennik, P. B., et al. (1998). "Highly efficient transduction of the green fluorescent protein gene in human umbilical cord blood stem cells capable of cobblestone formation in long-term cultures and multilineage engraftment of immunodeficient mice." Blood **92**(11): 4013-4022.

Vincent, J., et al. (2010). "5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity." Cancer Res **70**(8): 3052-3061.

## **W**

Weerth, S., et al. (1999). "Encephalitogenic and neuritogenic T cell responses to the myelin-associated glycoprotein (MAG) in the Lewis rat." J Neuroimmunol **95**(1-2): 157-164.

Weiner, H. L. (2001). "Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells." Immunol Rev **182**: 207-214.

Weissert, R., et al. (1998). "MHC haplotype-dependent regulation of MOG-induced EAE in rats." J Clin Invest **102**(6): 1265-1273.

Wekerle, H., et al. (1994). "Animal models." Ann Neurol **36 Suppl**: S47-53.

Wieder, R., et al. (1991). "Increased efficiency of retroviral-mediated gene transfer and expression in primate bone marrow progenitors after 5-fluorouracil-induced hematopoietic suppression and recovery." Blood **77**(3): 448-455.

Williams, D. A., et al. (1984). "Introduction of new genetic material into pluripotent haematopoietic stem cells of the mouse." Nature **310**(5977): 476-480.

Wilms, H., et al. (2010). "Dimethylfumarate inhibits microglial and astrocytic inflammation by suppressing the synthesis of nitric oxide, IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 in an in-vitro model of brain inflammation." J Neuroinflammation **7**: 30.

Witowski, J., et al. (2004). "Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses." Cell Mol Life Sci **61**(5): 567-579.

Wolf, J. K., et al. (2004). "A phase I study of Adp53 (INGN 201; ADVEXIN) for patients with platinum- and paclitaxel-resistant epithelial ovarian cancer." Gynecol Oncol **94**(2): 442-448.

Wong, S. T., et al. (2008). "What Do People Think Is Important about Primary Healthcare?" Healthc Policy **3**(3): 89-104.

Woods, N. B., et al. (2006). "Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma." Nature **440**(7088): 1123.

Wraith, D. C., et al. (1989). "Antigen recognition in autoimmune encephalomyelitis and the potential for peptide-mediated immunotherapy." Cell **59**(2): 247-255.

Wujek, J. R., et al. (2002). "Axon loss in the spinal cord determines permanent neurological disability in an animal model of multiple sclerosis." J Neuropathol Exp Neurol **61**(1): 23-32.

## **X**

Xiang, X., et al. (2009). "Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes." Int J Cancer **124**(11): 2621-2633.

## **Y**

Yao, Z., et al. (1995). "Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells." J Immunol **155**(12): 5483-5486.

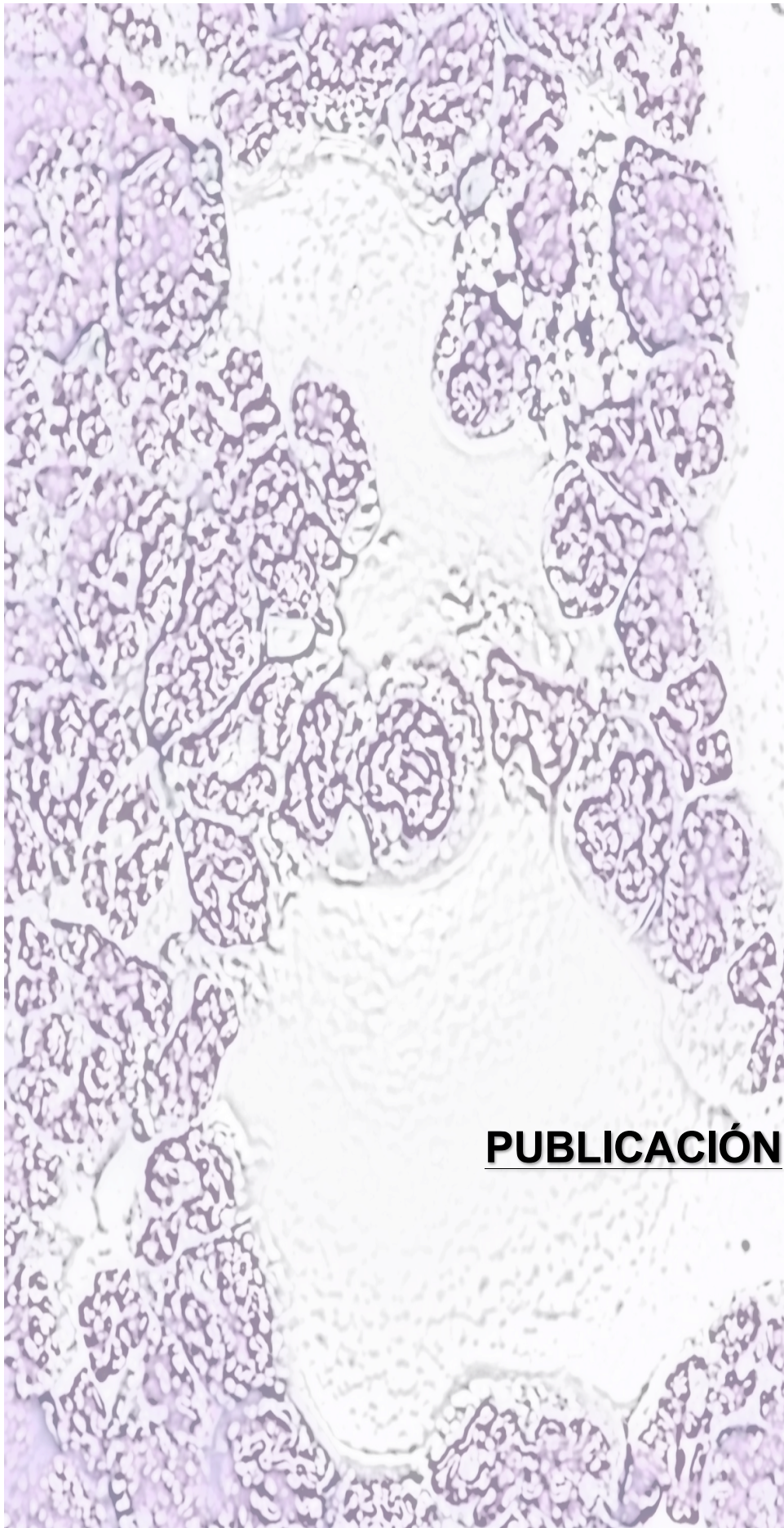
Yee, J. K., et al. (1994). "Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range." Methods Cell Biol **43 Pt A**: 99-112.

Yilmaz, O. H., et al. (2006). "SLAM family markers are conserved among hematopoietic stem cells from old and reconstituted mice and markedly increase their purity." Blood **107**(3): 924-930.

Yin, B., et al. (2010). "Myeloid-derived suppressor cells prevent type 1 diabetes in murine models." J Immunol **185**(10): 5828-5834.

## **Bibliografia**

- Yin, T. and L. Li (2006). "The stem cell niches in bone." J Clin Invest **116**(5): 1195-1201.
- Yong, V. W. (2002). "Differential mechanisms of action of interferon-beta and glatiramer acetate in MS." Neurology **59**(6): 802-808.
- Youn, J. I. and D. I. Gabrilovich (2010). "The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity." Eur J Immunol **40**(11): 2969-2975.
- Youn, J. I., et al. (2008). "Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice." J Immunol **181**(8): 5791-5802.
- Young, L. S., et al. (2006). "Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application." J Pathol **208**(2): 299-318.
- Yu, S. F., et al. (1986). "Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(10): 3194-3198.
- Yuasa, K., et al. (2002). "Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles evokes enhanced immune response against the transgene product." Gene Ther **9**(23): 1576-1588.
- Z**
- Zamvil, S. S. and L. Steinman (1990). "The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis." Annu Rev Immunol **8**: 579-621.
- Zhong, M. C., et al. (2000). "T-cells specific for soluble recombinant oligodendrocyte-specific protein induce severe clinical experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2(b) and H-2(s) mice." J Neuroimmunol **105**(1): 39-45.
- Zhou, Z., et al. (2010). "Development and function of myeloid-derived suppressor cells generated from mouse embryonic and hematopoietic stem cells." Stem Cells **28**(3): 620-632.
- Zuniga-Pflucker, J. C. (2004). "T-cell development made simple." Nat Rev Immunol **4**(1): 67-72.



**PUBLICACIÓN**



## Myeloid-Derived Suppressor Cells Are Generated During Retroviral Transduction of Murine Bone Marrow

Alba Gomez,\*<sup>1</sup> Carmen Espejo,†<sup>1</sup> Herena Eixarch,† Silvia Casacuberta-Serra,\*  
Maria Jose Mansilla,\* Rebeca Sanchez,\* Sonia Pereira,\* Sergio Lopez-Estevez,\*  
Ramon Gimeno,\* Xavier Montalban,† and Jordi Barquinero\*

\*Gene and Cell Therapy Laboratory, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR),  
Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

†Unitat de Neuroimmunologia Clínica, Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya (CEM-Cat),  
Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Hospital Universitari Vall d'Hebron,  
Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Previous work by our group showed that transferring bone marrow cells transduced with an autoantigen into nonmyeloablated mice with experimental autoimmune encephalomyelitis induced immune tolerance and improved symptoms of the disease. Because this effect occurred in the absence of molecular chimerism, we hypothesized that the cells responsible did not have repopulating ability and that they were not mediating central but peripheral tolerance mechanisms. In the present study, we analyzed the immunophenotype of the cells that are generated in the transduction cultures and we evaluated the immunosuppressive activity of the main cell subpopulations produced. We show that both granulocytic (CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>hi</sup>) and monocytic (CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>lo</sup>) myeloid-derived suppressor cells (G- and M-MDSCs, respectively) are generated during standard 4-day  $\gamma$ -retroviral transduction cultures (representing about 25% and 40% of the total cell output, respectively) and that the effectively transduced cells largely consist of these two cell types. A third cell population representing about 15% of the transduced cells did not express CD45 or hematopoietic lineage markers and expressed mesenchymal stromal cell markers. Transduced total bone marrow cells and sorted M-MDSCs expressed arginase and inducible nitric oxide synthase activities, produced reactive oxygen species, and inhibited antigen-induced T-cell proliferation *in vitro*. Transgene-expressing MDSCs could be exploited therapeutically to induce tolerance in autoimmune diseases and in gene therapy protocols.

Key words: Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs); Hematopoietic cells; Bone marrow cultures; Retroviral transduction; Experimental autoimmune encephalomyelitis; Autoimmune diseases

### INTRODUCTION

Retroviral-mediated gene transfer into hematopoietic cells, which constitutes the most successful clinical gene therapy approach to date, has traditionally involved culturing the target cells for several days with vector-containing supernatants, under conditions aimed to induce the cycling of immature hematopoietic progenitors while minimizing cell differentiation. Such conditions include exposure to different combinations of cytokines and hematopoietic growth factors. For murine hematopoietic stem cell (HSC) transduction, these combinations have traditionally included the early acting cytokines, stem cell factor (SCF), interleukin (IL)-3, IL-6, and IL-11 (1,24), whereas for human hematopoietic progenitors the most common cocktails include SCF, thrombopoietin (Tpo), IL-6, and *fms*-related tyrosine kinase 3 ligand (Flt3L), among others.

These cytokine combinations inhibit apoptosis and promote cell survival and cycling of the immature progenitors, and for this reason these cytokines have also been used in HSC expansion protocols (45,51). Yet, these conditions are not only associated with a loss of repopulating ability (20) but also drive, to a greater or lesser extent, a certain degree of myeloid differentiation (9). Indeed, the vast majority of cells that are generated under this type of culture conditions after several days express myeloid markers. However, the exact composition and the immunologic activity of these myeloid cell populations generated during retroviral transduction of murine bone marrow (BM) cells are not well known.

Different types of BM-derived cells, including B cells, dendritic cells (DCs), and other cell types, can function as tolerogenic antigen-presenting cells (APCs)

Received August 7, 2012; final acceptance November 7, 2012. Online prepub date: November 27, 2012.

<sup>1</sup>These authors provided equal contribution to this work.

Address correspondence to Jordi Barquinero, Laboratory of Gene and Cell Therapy, Vall d'Hebron Institut de Recerca, Passeig Vall d'Hebron 119-129, Barcelona 08035, Spain. Tel: +34 932746726; Fax: +34 932746727; E-mail: [jordi.barquinero@vhir.org](mailto:jordi.barquinero@vhir.org)

(8,10). Immature myeloid cell populations with suppressive effects on T-cell responses were first reported four decades ago and were found to accumulate in the BM, spleen, and lymphoid tissues of tumor-bearing mice. Known as myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) (12), they constitute a highly heterogeneous cell population that essentially has an immature phenotype and that, upon activation, suppresses adaptive immune responses. Murine MDSCs are defined as cluster of differentiation 11b positive [CD11b<sup>+</sup> or macrophage antigen alpha polypeptide (Mac-1<sup>+</sup>)] and granulocyte receptor-1 positive (Gr-1<sup>+</sup>), and at least two different populations of MDSCs have been described: the CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>hi</sup> [lymphocyte antigen 6 complex, locus G<sup>+</sup> (Ly6G<sup>+</sup>) Ly6C<sup>lo</sup>] or G-MDSCs and the CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>lo</sup> (Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>hi</sup>) or M-MDSCs. These two subtypes not only differ in their morphology and immunophenotype but also in their suppressive mechanisms (47): M-MDSCs are characterized by the production of nitric oxide (NO), whereas G-MDSCs produce high amounts of reactive oxygen species (ROS) (29,50). In addition to their nonspecific immunosuppressive properties, MDSCs are APCs that can present antigens in a tolerogenic manner (33).

We previously transduced murine BM cells with a viral vector encoding a peptide of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG<sub>40-55</sub>), an autoantigen used to induce experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a model of multiple sclerosis. These cells induced tolerance and had a therapeutic effect upon transfer into mice with established MOG-induced EAE (5). The effect was dependent on transgene (antigen) expression in the transferred cells, and this was observed both in partially myeloablated and in nonablated recipients. Interestingly, the effect was seen very soon after BM cell infusion and it occurred in the absence of transduced cell engraftment. In fact, in these experiments, the cells transduced with the autoantigen were rejected in virtually all transplanted animals, including those undergoing sublethal myeloablation, most likely because of the previous immunization with the antigen used to induce the experimental disease. Thereafter, we hypothesized that the therapeutic effect was not dependent on central tolerance (which would necessarily be required for hematopoietic engraftment or repopulation), but rather was due to other types of transduced cells functioning as APCs, and was most likely mediated by peripheral tolerance mechanisms. In the present study, we have characterized the cell populations generated during retroviral transduction of murine BM cells. We show, for the first time, that the majority of the transduced cells generated during murine retroviral transduction are indeed MDSCs and that they comprise both MDSC subpopulations, and that, at least the M-MDSCs exhibit inducible NO synthase (iNOS) and arginase activity, produce ROS and are able to suppress T-cell responses *in vitro*.

## MATERIALS AND METHODS

### *Retroviral Vectors and Cell Lines*

The generation of the pSF91-major histocompatibility complex (MHC) class II accessory molecule invariant chain-internal ribosome entry site-enhanced green fluorescent protein (pSF91-Ii-IRES-EGFP or Ii) and the pSF91-IiMOG-IRES-EGFP (or IiMOG) vectors is described elsewhere (5). We used the stable human vector-producing cell lines phoenix ecotropic (NX-e)/IiMOG and NX-e/Ii, which yield high viral titers (approximately 10<sup>6</sup> infectious particles per milliliter). These two cell lines were generated in our laboratory from the ecotropic NX-e packaging cell line (a gift from G. Nolan, Stanford University, CA, USA). Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) that was supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, 50 IU/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin (all from PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria). The mouse myelomonocytic WEHI-3B cell line was used as a positive control in nitrite and ROS production and arginase activity assays. The murine fibroblastic NIH 3T3 cell line was used as a negative control in the ROS production assay. Both cell lines were purchased from the ATCC (Manassas, VA, USA).

### *Mice and EAE Induction*

Thirty 6- to 8-week-old female congenic protein tyrosine phosphatase, receptor type, C allele a peptidase C allele B (B6/SJL-Ptprc<sup>a</sup>Pep3<sup>b</sup>/BoyJ) mice were bred in our animal facility from an original reproductive couple sourced from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). The mice were housed under standardized light- and climate-controlled conditions and were fed with standard chow and water *ad libitum*. All experiments were performed in accordance with EU regulations and were approved by our Institutional Ethics Committee on Animal Experimentation. For EAE induction, anesthetized mice were immunized by subcutaneous injections of PBS containing 100 µg of MOG<sub>40-55</sub> (Proteomics Section, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain) that was emulsified in complete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) containing 4 mg/ml of *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). On days 0 and 2 postimmunization (p.i.), mice received 250 ng of pertussis toxin (Sigma-Aldrich) intravenously (7).

### *BM Cell Transduction*

BM cells from donor mice were obtained by crushing the femurs, tibiae, and iliac crests of the donor mice 5 days after 5-fluorouracil (5-FU) treatment (100 mg/kg, intraperitoneally; Ferrer Farma, Barcelona, Spain) as previously described (3). Cells were seeded at a density of 10<sup>6</sup> mononuclear cells (MNCs)/ml on Retronectin® (Takara Bio Inc., Otsu, Japan) precoated plates (Nunc,

Roskilde, Denmark). Cells were prestimulated for 48 h either with 10% conditioned medium (see the next section for how obtained) from the WEHI-3B cell line, as a source of mIL-3, and 8% conditioned medium from the baby hamster kidney-murine c-kit ligand (BHK-MKL) cell line (a gift from S. Tsai, Seattle, WA, USA), as a source of mSCF, as previously described (37). Alternatively, we used combinations of the following recombinant murine cytokines: mSCF, mTpo, mFlt3L, and mIL-3 (Immunotools, Friesoythe, Germany, all at 10 ng/ml). For two consecutive days, 90% of the culture medium was replaced daily by filtered (0.45  $\mu$ m; Thermo Scientific Nalgene, Waltham, MA, USA) supernatants of the vector-producing cell lines plus the corresponding percentages of conditioned media or the recombinant cytokines and 4  $\mu$ g/ml protamine sulfate (Rovi S.A., Madrid, Spain). On day 4 (24 h after the second infection cycle), the BM cells were harvested using Cell Dissociation Buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and transduction efficiency was assessed by flow cytometry. A fraction of the cells was labeled with monoclonal antibodies, and the two major myeloid cell populations were sorted (see the next section). Both unsorted and sorted cell populations were then used for further in vitro studies.

#### *Obtaining Conditioned Media*

For the BHK/MKL cell line,  $10^6$  cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640; PAA) medium supplemented with 10% FCS, 2 mM glutamine and 50 UI/ml penicillin/50  $\mu$ g/ml streptomycin on a T75 flask (Nunc). Once confluent, the cells were harvested and a 1/10 aliquot was cultured in at least four T175 flasks with 50 ml of medium for 7 days. The medium was then filtered (0.45  $\mu$ m) and aliquots were stored at  $-80$  C until used.

For the WEHI-3B cell line,  $10^6$  cells were cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM; PAA) supplemented with 10% FCS, 2 mM glutamine, 50 UI/ml penicillin/50  $\mu$ g/ml streptomycin, and 0.05 mM  $\beta$ -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) on a T75 flask. Once confluent, the culture was split into at least four T175 flasks in 50 ml of medium. Once these cultures are confluent, the cells were harvested and a 1/10 aliquot was cultured in T175 flasks with 50 ml of medium for 7 days. The medium was then filtered (0.45  $\mu$ m) and aliquots were stored at  $-80$  C until used.

#### *Immunophenotypic Analysis and Cell Sorting*

Cell-surface staining was performed using the anti-mouse antibodies listed in Table 1. Labeled cells were analyzed using a FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and the FCS Express software (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA). Cell sorting of the M-MDSC and G-MDSC populations was performed

using a MoFlo cell sorter (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark). Photomicrography pictures were taken under a 600 $\times$  magnification using an Olympus DP70 camera adapted to an Olympus BX61 microscope, and the image capture software DP-BSW (Olympus, Tokyo, Japan). Lineage-negative (Lin<sup>-</sup>) cells were analyzed using allophycocyanine (APC)-labeled Ab cocktail, which included CD3, CD4, CD8, CD11b, CD19, and Gr-1. Lineage-negative population was defined as CD45.1<sup>+</sup> and negative for our Lin(-APC) cocktail. Dead cells were excluded by adding 7-amino-actinomycin (7-AAD) (Invitrogen) to the cell preparations prior to flow cytometric analyses at a final concentration of 5  $\mu$ g/ml.

#### *Suppression of MOG<sub>40-55</sub>-Induced T-Cell Proliferation*

Transduced total BM cells or the sorted MDSC populations were irradiated using a CisBio International IBL 437C gamma irradiator (Bagnols-Ceze, France), which uses a source of cesium 137 (<sup>137</sup>Cs) at a dose rate of 2.35 Gy/min (total, 25 Gy), and were added at different proportions to  $10^5$  splenocytes from mice with EAE (day 7 p.i.). The cells were then cultured in the presence or absence of 5  $\mu$ g/ml MOG<sub>40-55</sub> in 96-well U-bottom plates (Nunc) for 48 h. One microcurie of [<sup>3</sup>H]thymidine (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) was then added to each well, and cells were allowed to proliferate for 18 h before the amount of incorporated radioactivity was measured in a scintillation counter (1450 Microbeta LSC, Wallac Oy, Turku, Finland). The percentage of suppression of T-cell proliferation was calculated using the following formula: percent suppression =  $[1 - (\text{cpm in the presence of MDSCs} / \text{cpm in the absence of MDSCs})] \times 100\%$ .

#### *Nitrite Production Assay and Arginase Activity*

A total of  $10^5$  transduced total BM cells, or the sorted cell subpopulations, were cultured in minimum essential medium with  $\alpha$  modification (MEM $\alpha$ ; Invitrogen) with or without lipopolysaccharide (LPS) (100 ng/ml) and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (100 U/ml; both from Sigma-Aldrich) in 24-well plates (Nunc) for 24 h. iNOS activity was analyzed by measuring nitrite (NO<sub>2</sub>) production in the supernatant using the Griess reaction (Sigma-Aldrich) in accordance with the manufacturer's recommendations. Arginase activity was measured as previously described (4). Briefly,  $10^6$  cells were lysed with 0.1% Triton X-100, and after 30 min, a buffer containing 25 mM Tris-HCl and 10  $\mu$ M MnCl<sub>2</sub> (pH 7.4) was added (all from Sigma-Aldrich). The reaction was halted by heating at 55°C for 10 min. Arginine hydrolysis was performed by incubating 50  $\mu$ l of the activated lysate with 25  $\mu$ l of 0.5 M L-arginine (pH 9.5; Sigma-Aldrich) at 37°C for 2 h. The reaction was stopped with 240  $\mu$ l of an acidic mixture [H<sub>2</sub>O/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%)/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96%), 7:3:1 v/v; Sigma-Aldrich]. Urea concentration was calculated from the optical densities

**Table 1.** List of Antibodies Used

Markers	Clone	Manufacturer
CD3-PE/APC	145-2C11	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
CD8-APC	53-6.7	BioLegend (San Diego, CA, USA)
CD4-bio/APC/APC-Cy7	RM4-5	Caltag Laboratories (Burlingame, CA, USA)
CD11b-APC	M1/70	BioLegend
CD11c-PerCP	N418	BioLegend
CD14-PE	RmC5-3	BD Biosciences
CD19-APC	6D5	BioLegend
CD29-FITC	Ha2/5	BD Biosciences
CD44-bio/PerCP	IM7	BioLegend
CD45.1-APC-Cy7	A20	BioLegend
CD90.2-PE	53-2.1	BD Biosciences
CD105-PE	MJ7/18	BioLegend
CD124-PE	mILR-M1	BD Biosciences
CD45R (B220)-bio	RA3-6B1	eBioscience (San Diego, CA, USA)
F4/80-PE/PerCP	BM8	BioLegend
Gr-1-PE-Cy7/APC	RB6-8C5	BioLegend/BD Biosciences
NK1.1-PE-Cy7	pk135	eBioscience
Ter-119-PE-Cy5/APC	TER-119	BD Biosciences
CD40-PE	3/23	BD Biosciences
CD80-PE	16-12A1	BD Biosciences
CD86-PE	GL1	BD Biosciences
I-A <sup>b</sup> -PE	AF6-120.1	BioLegend
H-2K <sup>b</sup> -PE	AF6-88.5	BioLegend
Ly6C-bio	AL-21	BD Biosciences
Ly6G-PE	1A8	BD Biosciences

CD3, cluster of differentiation 3; PE, phycoerythrin; APC, allophycocyanin; bio, biotin; cy7, cyanine 7; PerCP, peridinin-chlorophyll-protein complex; FITC, fluorescein isothiocyanate; F4/80, mouse homolog of epidermal growth factor (EGF)-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1; Gr-1, granulocyte receptor 1; NK 1.1, natural killer 1.1; TER-119, lymphocyte antigen 76 (ly76); I-A<sup>b</sup>, major histocompatibility complex (MHC) class II; H-2K<sup>b</sup>, MHC class I; Ly6C, lymphocyte antigen 6 complex, locus C.

measured at 550 nm in a Triturus® Immunoassay System (Grifols, Barcelona, Spain) after the addition of 10 µl of 6% α-isonitrosopropiophenone (Sigma-Aldrich), and the entire mixture was dissolved in absolute ethanol and heated at 100°C for 30 min. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 µmol of urea per minute. The WEHI-3B cell line was used as a positive control for both assays.

#### ROS Detection

ROS production by MDSCs was measured at day 4 of transduction culture using the oxidation-sensitive probe CellROX™ Deep Red Reagent (Invitrogen). Cells were incubated with the transduction media in the presence of 5 µM of CellROX™ for 30 min at 37°C according to the manufacturers' instructions. NIH 3T3 and WEHI-3B cell lines were used as negative and positive controls, respectively. Cells were washed with cold PBS, labeled with conjugated anti-CD11b and anti-Gr-1 antibodies, and analyzed using a FACSCanto flow cytometer.

#### Cell Morphology

The cells were cytopun onto microscope slides and stained using the May Grünwald-Giemsa method

(Sigma-Aldrich) to allow the morphology of the cells to be visualized.

#### Statistical Analysis

Data are expressed as the mean (SD) unless otherwise stated. Comparisons between means were performed using a Student's *t* test (11), paired or unpaired, depending on the type of data, and with one or two tails, depending on the hypothesis. For multiple comparisons, one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test correction was performed. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant. The statistical analysis was performed and the figures were generated using the software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

## RESULTS

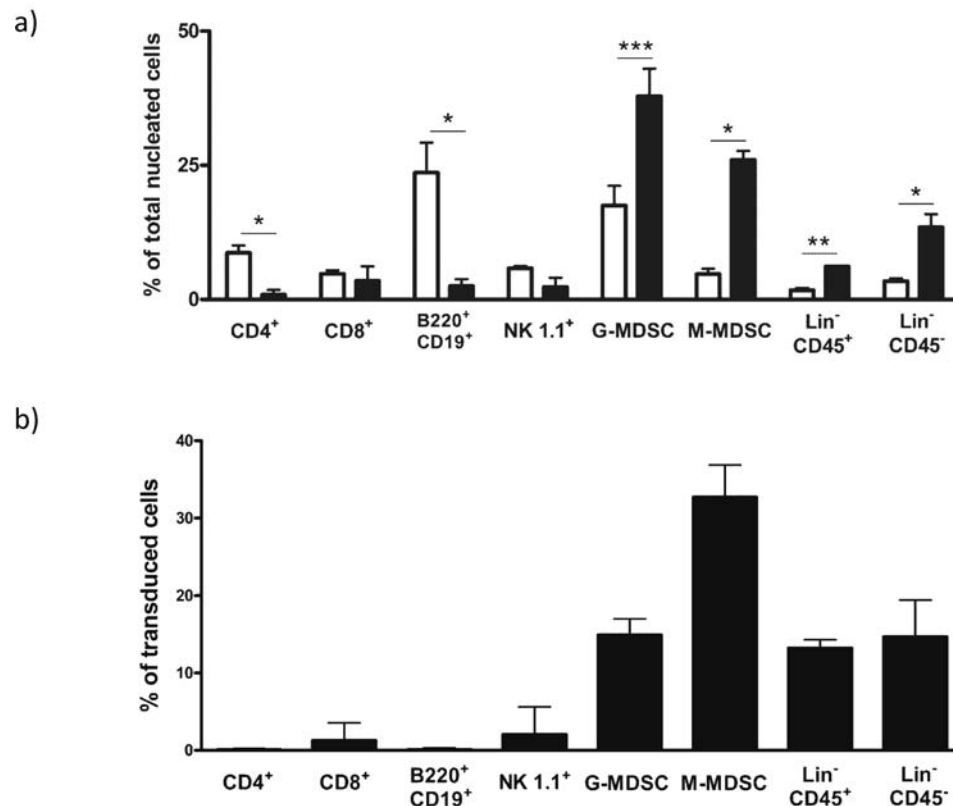
### BM Cell Transduction Cultures Drive Myeloid Differentiation

BM cells were obtained as a single-cell suspension from 5-FU-treated mice (100 mg/kg intraperitoneally on day -5) by crushing femora, tibiae, and the iliac crests in a mortar and sieving through a 70-µm sterile nylon filter. Immunophenotypic analyses were performed before

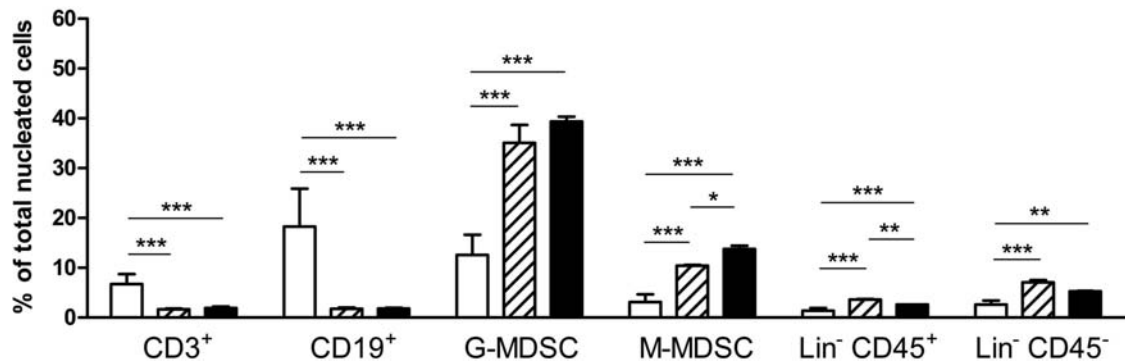
and after transduction (days 0 and 4). On day 4, the proportions of B220<sup>+</sup> (CD45R), CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and natural killer (NK) 1.1<sup>+</sup> cells were greatly reduced, whereas those of nonhematopoietic [CD45<sup>-</sup> lineage (Lin)<sup>-</sup>] cells and cells expressing CD11b and Gr-1 myeloid markers were significantly increased compared with fresh BM cells (day 0). Indeed, the percentage of the two subtypes of G-MDSCs and M-MDSCs increased by two- and five-fold, respectively (Fig. 1a). The absolute number of cells of these subtypes also increased, indicating that they were generated de novo or were expanded during culture. On day 4, the transduction efficiency (measured as the percentage of EGFP<sup>+</sup> cells) was 29.1% (0.9) [mean (SD)] for the MOG-encoding vector and 30.2% (1.2) for the control vector. The effectively transduced cells mainly consisted of populations of M-MDSCs, G-MDSCs, Lin<sup>-</sup> CD45<sup>+</sup>, and Lin<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup> cells, which represented 37.9% (10.2), 26% (3.4), 6.1% (0.3), and 13.5% (4.2) of the total cells, respectively (Fig. 1b). To determine whether this differentiation pattern was specific to our culture conditions,

which involved the use of conditioned media as a source of cytokines, we analyzed the phenotype of BM cells transduced using more standard and defined combinations of recombinant cytokines. Two cytokine combinations containing recombinant murine SCF (mSCF), murine Tpo (mTpo), and murine Flt3L (mFlt3L) in the presence and in the absence of murine IL-3 (mIL-3) resulted in similar proportions of cell subpopulations to those described above (Fig. 2). In this regard, the presence of mIL-3 resulted in a significantly higher percentage of M-MDSCs and a lower percentage of Lin<sup>-</sup> CD45<sup>+</sup> (immature progenitors). Additionally, to determine whether the generation of MDSCs was dependent on retroviral transduction itself, we performed BM cultures using conditions similar to those of transduction but skipping the vector exposure steps. These cultures yielded similar percentages of myeloid cell subpopulations than those using viral vectors (data not shown).

A further phenotypic characterization of the two myeloid cell populations is summarized in Figure 3. Both



**Figure 1.** Cell populations in fresh and MOG-transduced BM cells. (a) Bars indicate the percentage of the different cell subpopulations within the bone marrow (BM) cells of 5-fluorouracil (5-FU)-treated mice at day 0 (white bars) and after the 4-day transduction culture (black bars). (b) The percentage of cell subpopulations within the transduced cells was analyzed by gating on enhanced green fluorescent protein positive (EGFP<sup>+</sup>) cells. Error bars correspond to standard deviations (SD). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  ( $n = 3$ ). MOG, myelin oligodendrocyte glycoprotein; CD4, cluster of differentiation 4; NK, natural killer; MDSC, myeloid-derived suppressor cell; Lin<sup>-</sup>, lineage negative.



**Figure 2.** Cell populations in fresh and MOG-transduced BM cells using two different combinations of recombinant cytokines. Bars represent the mean percentages of the different cell subpopulations at day 0 (white bars) and after the 4-day transduction culture in the presence of mouse stem cell factor (mSCF), mouse fms-related tyrosine kinase 3 ligand (mFlt3L), and mouse thrombopoietin (mTpo; patterned bars) or this mixture plus mouse interleukin-3 (mIL-3; black bars). Error bars correspond to SD. Comparisons were made using the one-way ANOVA test with the Bonferroni posttest correction. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  ( $n = 3$ ).

types of MDSCs were largely CD14<sup>-</sup> cells expressing MHC class I (H-2K<sup>b+</sup>) and low levels of class II (I-A<sup>b+</sup>). However, in contrast to G-MDSCs, M-MDSCs expressed low levels of F4/80 [mouse homolog of epidermal growth factor (EGF)-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1], CD124 (IL-4 receptor  $\alpha$  chain, IL-4R $\alpha$ ) and the costimulatory molecules CD80, CD86, and CD40 (Fig. 3a). CD11c expression was observed in only a small percentage of CD11b<sup>+</sup> cells, but these cells were Gr-1<sup>-</sup> (data not shown). To determine whether labeling with the anti-Gr-1 antibody was equivalent to that using the Ly6G/Ly6C antibodies, we stained transduced BM cell samples with anti-CD11b and either anti-Gr-1 or the combination Ly6-G/Ly6C (see Table 1). The percentages of CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>hi</sup> and CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>lo</sup> cell populations were analogous to those of CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>lo</sup> and CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>hi</sup> cells, respectively, as previously reported (data not shown). Sorted G-MDSC and M-MDSC populations (mean purity >98%) were cytopun onto microscope slides and were stained using the May Grünwald-Giemsa method. Morphologically, the G-MDSC population was enriched for cells with ring-shaped and segmented nuclei, which resembled granulocytes or granulocyte precursors, whereas M-MDSCs resembled monocytes (Fig. 3b).

To determine whether BM-derived Lin<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup> cells were mesenchymal stromal cells (MSCs), BM cells transduced for 4 days were labeled with a cocktail of allophycocyanin (APC)-labeled antibodies against Lin markers [CD3, CD45R, CD11b, Gr-1, and TER-119 (lymphocyte antigen 76; ly76)] and a series of antibodies to MSC markers (see Table 1). Most Lin<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup> cells were also CD29<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup>, and they majorly expressed CD90, CD105, low levels of MHC class I, and no class II, a phenotype that is equivalent to that of MSCs (Fig. 4). Due to technical difficulties that we found in obtaining enough numbers of pure or highly enriched MSC populations, and because

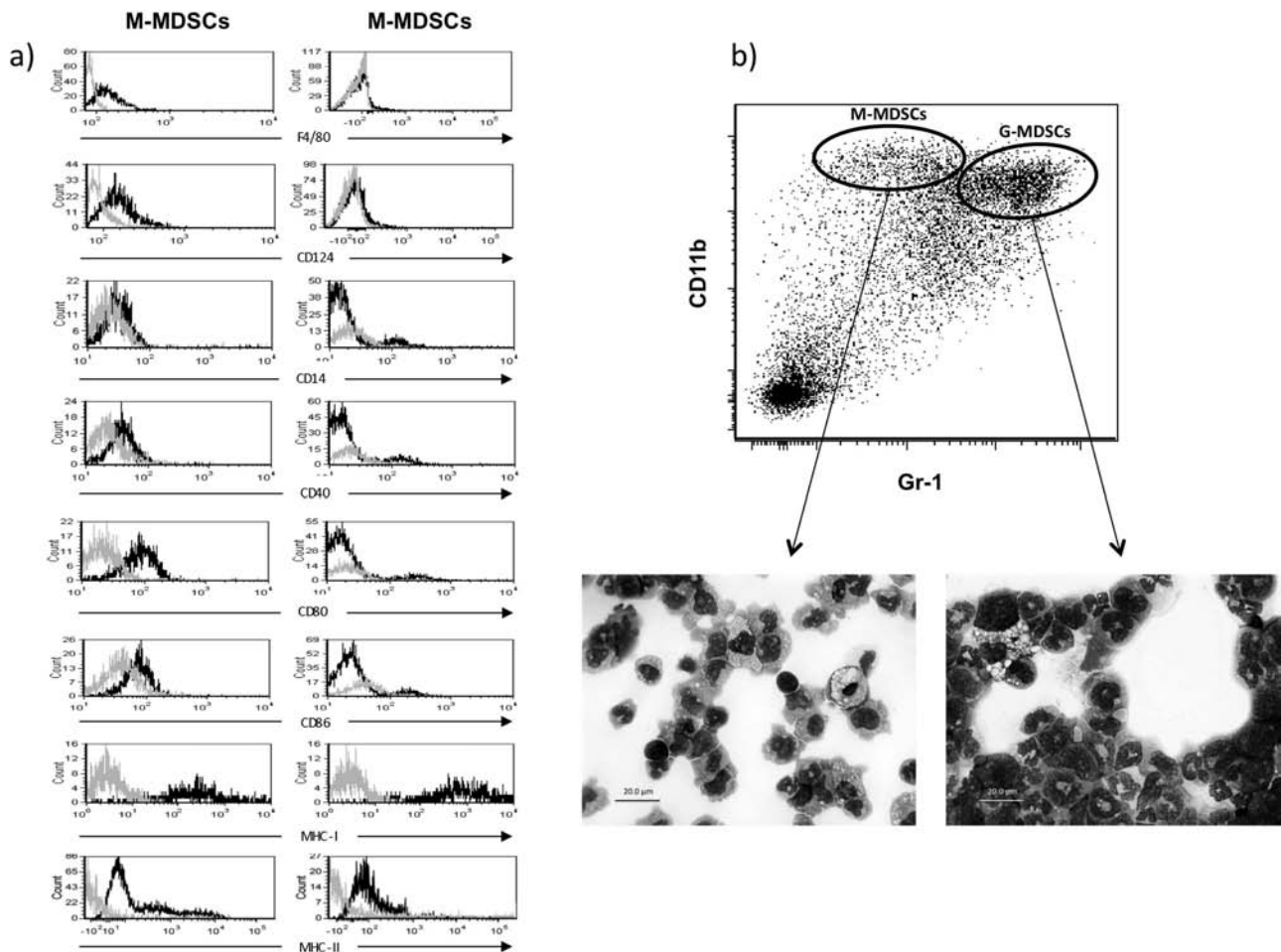
the immunosuppressive ability of such cells has been extensively reported by many authors (41), for the functional studies we decided to focus on the myeloid component that included the two major MDSC populations.

#### *Total BM Cells and Purified Myeloid Cell Subpopulations Have Arginase and iNOS Activities and Generate ROS*

The activities of the enzymes arginase and iNOS, which are two important mediators of the suppressive effects of MDSCs, were analyzed in transduced total BM cells and in the two myeloid cell subpopulations using colorimetric assays. As shown in Figure 5, total BM cells displayed the highest basal levels of arginase, but M-MDSCs were the only cell type that significantly increased the enzyme activity (twofold) upon stimulation with LPS and IFN- $\gamma$ . As for iNOS activity, basal levels were negligible in all cell types, but they were significantly increased in total BM cells (sixfold) and M-MDSCs (10-fold) upon stimulation. This last cell population also showed a significantly higher level of ROS production in comparison with total BM cells or G-MDSC (Fig. 5).

#### *Cultured BM Cells and Purified Myeloid Cell Subpopulations Suppress MOG<sub>40-55</sub>-Induced T-Cell Proliferation*

To determine whether the cells generated during transduction suppressed T-cell responses, transduced total BM cells and the sorted myeloid cell subpopulations were irradiated (2500 cGy) and cultured at different ratios in the presence of MOG<sub>40-55</sub> with splenocytes obtained from MOG-induced EAE mice, and proliferative responses were analyzed by tritiated thymidine incorporation assays. Transduced total BM cells and the two MDSC populations inhibited antigen-induced splenocyte proliferation. However, although G-MDSCs exhibited similar suppressive activity



**Figure 3.** Immunophenotype and morphology of MOG-transduced MDSCs. (a) Histograms correspond to the immunophenotypic characterization of G-MDSC and M-MDSC subpopulations analyzed using a first forward scatter (FSS)-SSC gating and a second SSC-7 aminoactinomycin D (7-AAD) gating to exclude dead cells from the analysis. Gray lines represent the isotype control and black lines the specific labeling with phycoerythrin (PE)-conjugated specific antibodies. (b) Photomicrographs show the morphology of the sorted populations of representative M-MDSCs (left) and G-MDSCs (right) upon May Grünwald-Giemsa staining. Note their monocyte-like and granulocyte-like morphology, respectively. F4/80, mouse homolog of epidermal growth factor (EGF)-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1; Gr-1, granulocyte receptor 1; MHC-I, major histocompatibility complex 1 (H-2K<sup>b</sup>); MHC-II, I-A<sup>b</sup>.

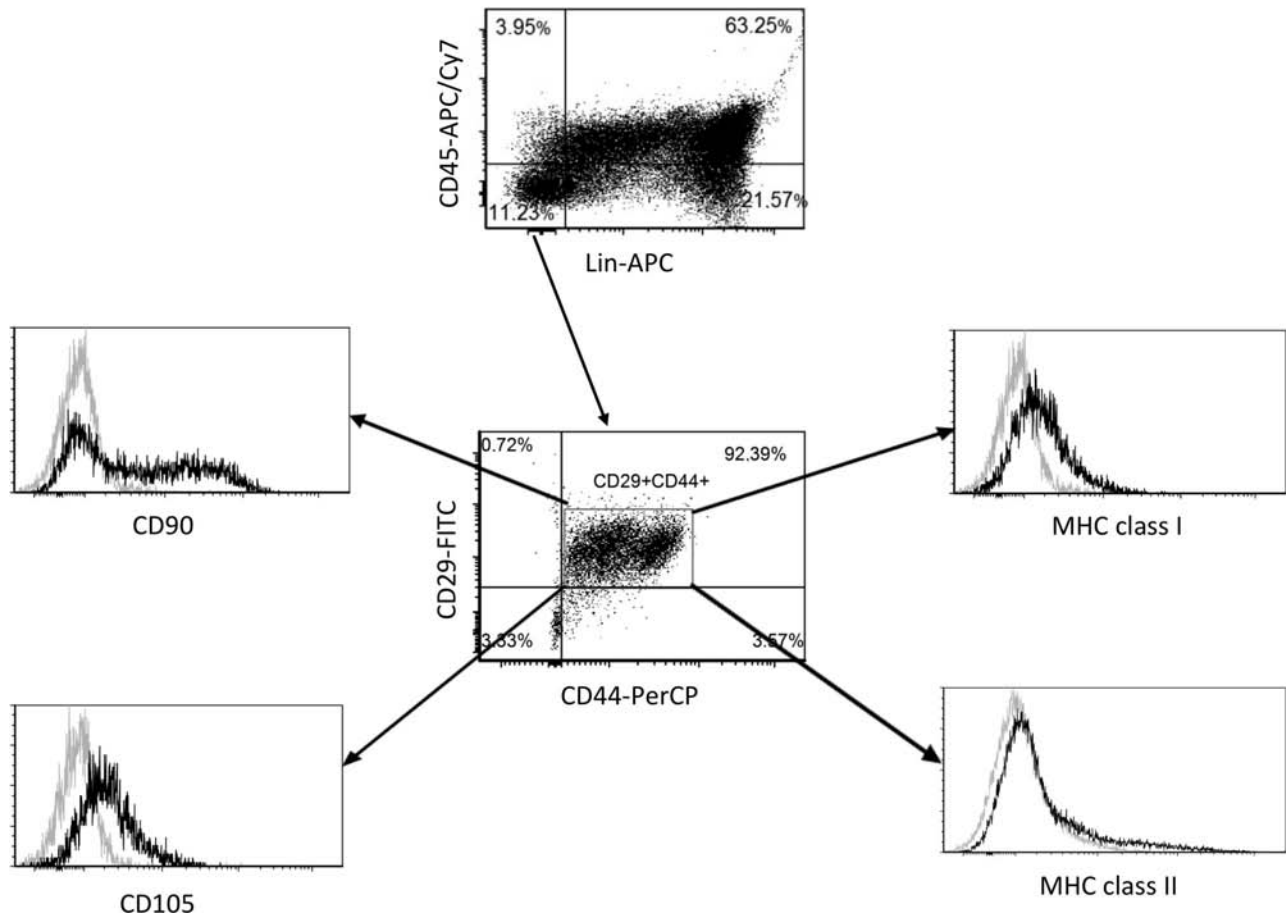
to that of M-MDSCs at low MDSC-splenocyte ratios, there was not a clear dose-dependent linear effect at higher ratios. As for BM cells and M-MDSCs, their suppressive effects were clearly dose dependent, and MOG-transduced cells suppressed antigen-specific proliferation to a higher extent than their sham-transduced controls, although the differences were not statistically significant at all the cell ratios tested (Fig. 6).

### DISCUSSION

In this work, we show that standard 4-day hematopoietic retroviral transduction cultures result in the generation of large amounts of M-MDSC and G-MDSC populations, which are able to suppress T-cell responses *in vitro*. Among the successfully transduced cells, the proportions of MDSCs are also very high, overall representing about

half of the total. Sorted M-MDSCs display higher levels of arginase and iNOS activity, ROS production, and a stronger suppressive effect on antigen-induced T-cell proliferation *in vitro* than G-MDSCs.

In mice, CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> cells represent about 20–30% of the nucleated BM cells (13). In our BM donors, we found lower percentages of these cells, which could be attributed to the effect of 5-FU, a chemotherapeutic drug that is usually administered 2 to 5 days prior to the BM culture to deplete cycling cells. This treatment enriches the BM in immature hematopoietic progenitors and ultimately induces their proliferation, a requisite for an efficient retroviral-mediated gene transfer. However, 5-FU has also been reported to kill MDSCs (44). Because  $\gamma$ -retroviral vectors can only transduce dividing cells, *ex vivo* gene transfer into hematopoietic cells generally relies on the exposure

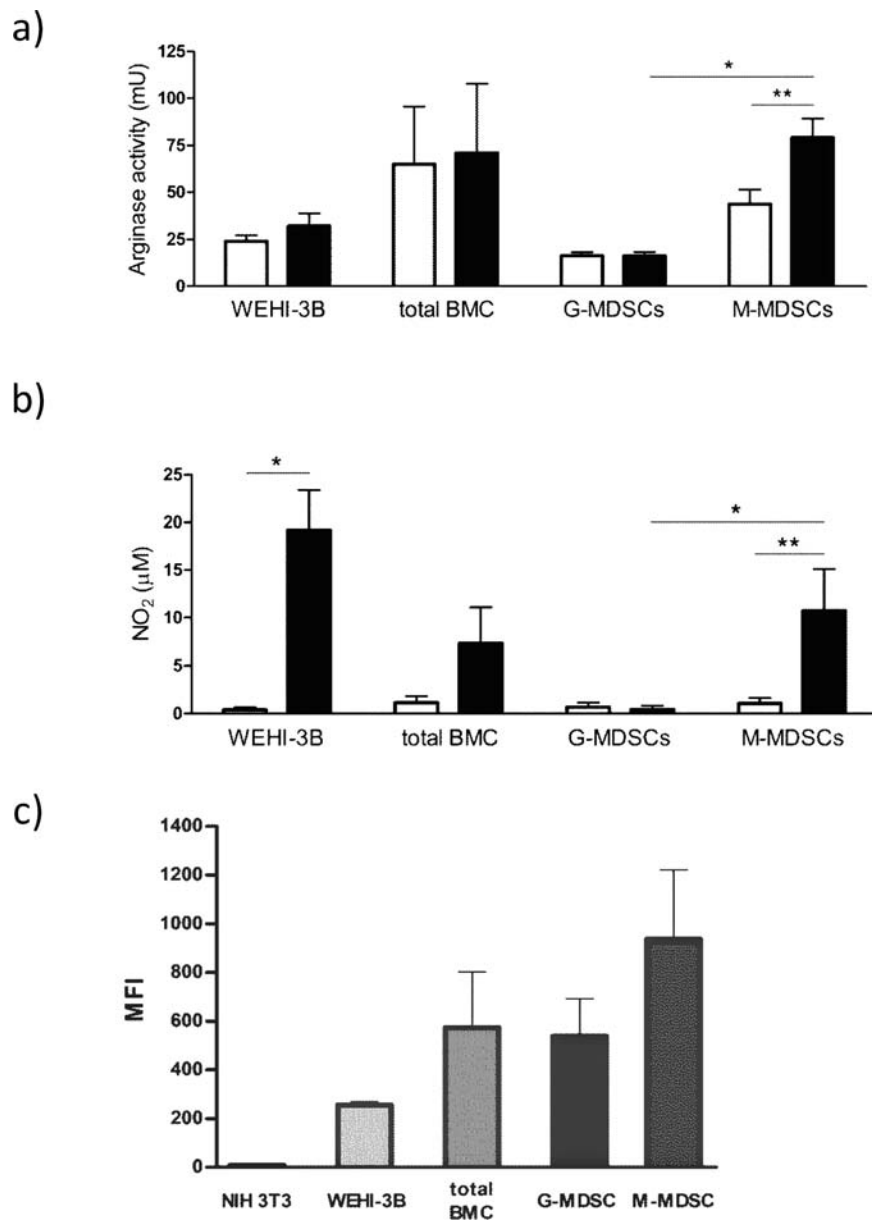


**Figure 4.** Phenotypic analysis of mesenchymal stromal cells (MSCs). BM cells were transduced for 4 days using the MOG-encoding vector, labeled with monoclonal antibodies, and analyzed by flow cytometry. Histograms show the gating strategy and the analysis of a representative sample. Cells were labeled with an anti-CD45 antibody, a combination of allophycocyanin (APC)-labeled antibodies against lineage (Lin) markers [anti-CD3, anti-CD45R, anti-CD11b, anti-Gr-1, and anti-TER-119 (lymphocyte antigen 76; ly76)], anti-CD29, and anti-CD44 antibodies (see Table 1). The labeled cells were then split into four tubes, and each sample was incubated with one of the following PE-labeled antibodies: anti-CD90, anti-CD105, anti-H2-K<sup>b</sup> (MHC class I), or anti-I-A<sup>b</sup> (MHC class II). Uniparametric histograms show the expression of these markers (gray line, isotype black line) on the gated Lin<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup> CD29<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> cell population. Cy7, cyanine 7; PerCP, peridinin-chlorophyll-protein complex; FITC, fluorescein isothiocyanate.

of cells to combinations of cytokines that promote cell survival and induce cell division. For murine hematopoietic cell transduction, the most common cytokine combinations include several of the following: SCF, IL-3, IL-6, IL-11, Tpo, and Flt3L (15). Some of these molecules have been implicated as contributing to the generation of MDSCs, including SCF (36), IL-6 (22), and Flt3L (23). Another factor that may facilitate the generation of MDSCs during retroviral transduction is the use of conditioned media derived from tumors or immortalized cell lines (38,46). Retroviral vectors are usually generated in packaging cell lines such as the human embryonic kidney (HEK)-293T, which is tumorigenic in mice. In addition, the supernatants that we used as a source of mSCF and mIL-3 were also conditioned from cultures of tumor-derived or tumorigenic cells (BHK-MKL and WEHI-3B cell lines, respectively).

However, the use of these two conditioned media was probably not critical for MDSC generation because their substitution by recombinant cytokines also resulted in the generation of similar proportions of MDSCs. The presence of IL-3 was found to significantly increase the proportion of M-MDSCs and reduce that of Lin<sup>-</sup> CD45<sup>+</sup> cells, in concordance with the reported effect of this cytokine in inducing myeloid differentiation and in favoring macrophage as opposed to granulocytic differentiation, especially when used in combination with Flt3L (18).

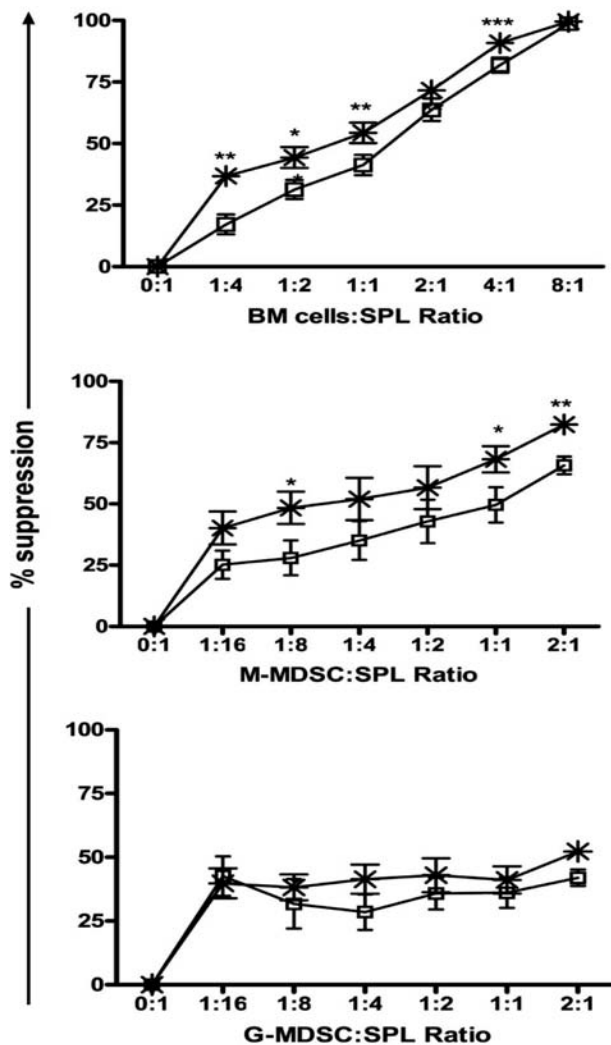
The myeloid cells generated in our transduction cultures fulfill many of the phenotypic and functional criteria that define MDSCs: They comprise a heterogeneous population of cells that express myeloid markers, including those characteristic of the two main subsets (G- and M-MDSCs), and, especially the M-MDSCs, express



**Figure 5.** Arginase and iNOS activities and ROS production by MOG-transduced MDSCs. M-MDSCs display higher levels of arginase (a) and induced nitric oxide synthase (iNOS) activity (b) upon stimulation with lipopolysaccharide (LPS) and interferon (IFN)- $\gamma$ , and reactive oxygen species (ROS) production (c). A total of  $10^5$  transduced BM cells or sorted M-MDSCs or G-MDSCs were tested for arginase and iNOS activity. The levels of arginase activity (top chart) and iNOS activity (middle chart) corresponding to the different cell types are shown for nonstimulated cells (white bars) and upon stimulation with LPS and IFN- $\gamma$  (black bars). The same numbers of mouse myelomonocytic WEHI-3B and mouse fibroblast NIH 3T3 cells were used as a positive and negative control, respectively. (c) ROS production (bottom chart) was measured by flow cytometry as described in Materials and Methods. M-MDSCs produced relatively higher amounts of ROS in comparison with G-MDSCs or total BM cells. BMC, bone marrow cells; MFI, mean fluorescence intensity. Error bars correspond to standard error of the mean (SEM). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  ( $n = 3$ ).

arginase and iNOS, produce ROS, and suppress adaptive immune responses. These MDSCs expressed MHC class I and low levels of class II molecules. In contrast to human MDSCs, which are more often defined as human leucocyte antigen (HLA)-DR<sup>low/-</sup>, murine MDSCs were reported to have variable expression of MHC class II

(25,32). Expression of MHC class II and CD40L was found to be induced in MDSCs upon activation, and this expression was required for mediating the generation of T regulatory (Treg) cells in vivo and for the induction of tolerance (35). The importance of MHC class II expression by MDSCs was also demonstrated by the fact



**Figure 6.** Transduced BM cells and sorted MDSCs subpopulations suppress antigen-induced T-cell proliferation. Charts show the percentage of suppression of MOG<sub>40-55</sub>-induced splenocyte proliferation by irradiated transduced total BM cells (top), purified M-MDSCs (middle), and purified G-MDSCs (bottom) transduced with either the vector encoding the MOG antigen (asterisks) or the control vector (empty squares). Error bars correspond to SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

that MDSCs from mice lacking such molecules failed to induce Treg cell expansion in vitro (48).

MDSCs may exert both nonspecific immune suppressive effects and antigen-specific suppression, thus leading to tolerance (14,19,21,30,33,39,40,42,48). However, because in our previous study MOG-induced EAE mice responded only to the transfer of BM cells transduced with the autoantigen (5), we can reasonably argue that tolerogenic antigen presentation is required for the therapeutic effect observed. This notion is also supported by the fact that the vector system used to express the antigen, in which the sequence encoding the class II invariant chain-derived

peptide (CLIP) region of the Ii has been replaced by the sequence encoding the antigenic peptide (MOG<sub>40-55</sub>), has already demonstrated to efficiently target antigen presentation via MHC class II (2). We show that MDSCs express both class I and class II MHC molecules, which are required for antigen presentation to T cells, and this is in agreement with a recent report demonstrating that MHC class II expression by MDSCs was essential for inducing CD4<sup>+</sup> T-cell tolerance (30). Finally, the higher level of suppression of splenocyte proliferation by total BM cells and M-MDSCs transduced with the antigen in comparison to that produced by their controls also support the notion of a tolerogenic antigen presentation by these cells to CD4<sup>+</sup> T cells. As for G-MDSCs, suppression activities were similar for both MOG-transduced and controls. A potential reason that may contribute to this apparent discrepancy is the fact that M-MDSCs are transduced at a much higher rate than G-MDSCs, most likely because of their higher proliferative rates (their fold expansion after the culture is about five times vs. two times for G-MDSCs). Consequently, at the end of the culture, effectively transduced M-MDSCs double the percentage of transduced G-MDSCs, despite the fact that the percentages of total G-MDSCs are about 1.5-fold higher than those of M-MDSCs, as seen in Figure 1. When calculating the effector/suppressor cell ratios for the suppression assays, we considered the relative amounts of total MDSCs that were present in the unfractionated BM cell population, but not those of effectively transduced cells, for practical reasons, and this has to be taken into account when comparing the results.

Arginase-1<sup>+</sup> MDSCs were reported to be present in the CNS-demyelinating lesions of mice with EAE in amounts that correlated with the clinical score, and these cells induced cell death when cocultured with splenocytes, suggesting that MDSCs could play a role in regulating autoimmune processes (28). Because different types of MDSCs can use different mechanisms of suppression, they may also have different tolerogenic potentials. Suppression by murine M-MDSCs is mediated by arginase-1, NO, prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and cytokines and does not require cell-to-cell contact. In contrast, suppression by G-MDSCs was reported to be mediated by ROS production (50), requires physical contact with T cells and is more often associated with tolerance induction (31,49). Surprisingly, we found higher levels of ROS production by M-MDSCs than by G-MDSCs, which is not in agreement with previous reports. This discrepancy may be explained by the different experimental conditions we used, for example, the exposure to cytokines such as IL-3, which may induce ROS production in murine hematopoietic cells (17).

Ex vivo generation of MDSCs can be suitable for therapeutic applications in transplantation (14), graft-versus-host disease (GVHD) (16,25), or autoimmunity (28,53). Different types of MDSCs can be generated by culturing

monocytes or hematopoietic progenitors in the presence of cytokines and growth factors (22,25), or tumor-derived products such as tumor exosomes (46) and conditioned media (6,34). As an illustrative example, MDSCs were generated from murine BM cultures after exposure to high doses of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) for 4 days, or to lower concentrations of the cytokine, and maintaining the cells in culture for 10 days. Different subsets of MDSCs including CD115<sup>+</sup> Ly-6C<sup>+</sup> (M-MDSCs) and CD115<sup>+</sup> Ly-6C<sup>-</sup> (G-MDSCs) populations can also be generated from mouse embryonic stem cells (ES) and adult BM cells. In vitro, ES- and BM-derived MDSCs suppressed T-cell proliferation induced by polyclonal stimuli or alloantigens via multiple mechanisms involving iNOS-mediated NO production and IL-10. In addition, they induced CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg cell development. In vivo, these cells prevented alloreactive T-cell-mediated GVHD upon adoptive transfer (52).

For human MDSCs, the cytokines GM-CSF, G-CSF, and IL-6 were reported to allow a rapid generation of MDSCs from precursors present in the BM and that the immunoregulatory activity of BM-MDSCs was dependent on the cytidine-cytidine-adenosine-adenosine-thymidine (CCAAT)-enhancer-binding protein (C/EBP) transcription factor (27). More recently, the same group described a promyelocytic-like population that was responsible for the immune suppression mediated by BM-MDSCs (43). Interestingly, in another report, BM-derived MSCs were found to transform activated murine peritoneal macrophages into cells with an immunoregulatory phenotype, and this effect was partially mediated by PGE<sub>2</sub> production (26).

To summarize, in this work we show that  $\gamma$ -retroviral transduction of murine hematopoietic cells using standard protocols generates transgene-expressing MDSCs that are suppressive in vitro. First and foremost, we believe that this immunomodulatory potential is of great relevance and could be clinically exploited as it may contribute to induce immune tolerance. Moreover, the possible generation of MDSCs with suppressive and/or tolerogenic activity should be prospectively addressed and taken into account in hematopoietic cell expansion protocols and in clinical gene therapy trials. In this regard, more experimental work including in vivo studies is required to validate or broaden these observations.

**ACKNOWLEDGMENTS:** We thank C. Baum (Hannover Medical School, Hannover, Germany) for providing the retroviral vector backbone. This work was supported by grants from the European Union FP6 (LSHB CT2004-005242, CONSERT) and the "Fondo de Investigación Sanitaria" (FIS), "Instituto de Salud Carlos III" (ISCIII), Ministry of Economy and Competitiveness (MEC), Spain (PI09/00237). The authors thank the "Red Española de Esclerosis Múltiple," from FIS (ISCIII), MEC, Spain (RD07/0060), and the "Ajuts per donar Suport als Grups de Recerca de Catalunya" (2009 SGR 793), which is sponsored by the "Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca" (AGAUR), Generalitat de

Catalunya, Spain. A.G. and S.P. were supported by a FI-AGAUR grant from the Generalitat de Catalunya. C.E., R.G., and J.B. are partially supported by the Miguel Servet program of the FIS (ISCIII), MEC, and by the Generalitat de Catalunya. H.E. is supported by the "Sara Borrell" program, FIS (ISCIII), MEC, Spain. The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

- Bernad, A.; Varas, F.; Gallego, J. M.; Almendral, J. M.; Bueren, J. A. Ex vivo expansion and selection of retrovirally transduced bone marrow: An efficient methodology for gene-transfer to murine lympho-haemopoietic stem cells. *Br. J. Haematol.* 87(1):6–17; 1994.
- Bischof, F.; Wienhold, W.; Wirblich, C.; Malcherek, G.; Zevering, O.; Kruisbeek, A. M.; Melms, A. Specific treatment of autoimmunity with recombinant invariant chains in which CLIP is replaced by self-epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(21):12168–12173; 2001.
- Bodine, D. M.; McDonagh, K. T.; Seidel, N. E.; Nienhuis, A. W. Survival and retrovirus infection of murine hematopoietic stem cells in vitro: Effects of 5-FU and method of infection. *Exp. Hematol.* 19(3):206–212; 1991.
- Corraliza, I. M.; Campo, M. L.; Soler, G.; Modolell, M. Determination of arginase activity in macrophages: A micromethod. *J. Immunol. Methods* 174(1–2):231–235; 1994.
- Eixarch, H.; Espejo, C.; Gomez, A.; Mansilla, M. J.; Castillo, M.; Mildner, A.; Vidal, F.; Gimeno, R.; Prinz, M.; Montalban, X.; Barquinero, J. Tolerance induction in experimental autoimmune encephalomyelitis using non-myeloablative hematopoietic gene therapy with autoantigen. *Mol. Ther.* 17(5):897–905; 2009.
- Eruslanov, E.; Daurkin, I.; Ortiz, J.; Vieweg, J.; Kusmartsev, S. Tumor-mediated induction of myeloid-derived suppressor cells and M2-polarized macrophages by altering intracellular PGE catabolism in myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* 88(5):839–848; 2010.
- Espejo, C.; Carrasco, J.; Hidalgo, J.; Penkowa, M.; Garcia, A.; Saez-Torres, I.; Martinez-Caceres, E. M. Differential expression of metallothioneins in the CNS of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience* 105(4):1055–1065; 2001.
- Eynon, E. E.; Parker, D. C. Small B cells as antigen-presenting cells in the induction of tolerance to soluble protein antigens. *J. Exp. Med.* 175(1):131–138; 1992.
- Fadilah, S. A.; Vuckovic, S.; Khalil, D.; Hart, D. N. Cord blood CD34<sup>+</sup> cells cultured with FLT3L, stem cell factor, interleukin-6, and IL-3 produce CD11c<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> myeloid dendritic cells. *Stem Cells Dev.* 16(5):849–855; 2007.
- Finkelman, F. D.; Lees, A.; Birnbaum, R.; Gause, W. C.; Morris, S. C. Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion. *J. Immunol.* 157(4):1406–1414; 1996.
- Fleming, K. K.; Bovaird, J. A.; Mosier, M. C.; Emerson, M. R.; LeVine, S. M.; Marquis, J. G. Statistical analysis of data from studies on experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 170(1–2):71–84; 2005.
- Gabrilovich, D. I.; Bronte, V.; Chen, S. H.; Colombo, M. P.; Ochoa, A.; Ostrand-Rosenberg, S.; Schreiber, H. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 67(1):425; 2007.
- Gabrilovich, D. I.; Nagaraj, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 9(3):162–174; 2009.

14. Garcia, M. R.; Ledgerwood, L.; Yang, Y.; Xu, J.; Lal, G.; Burrell, B.; Ma, G.; Hashimoto, D.; Li, Y.; Boros, P.; Grisotto, M.; van Rooijen, N.; Matesanz, R.; Tacke, F.; Ginhoux, F.; Ding, Y.; Chen, S. H.; Randolph, G.; Merad, M.; Bromberg, J. S.; Ochando, J. C. Monocytic suppressive cells mediate cardiovascular transplantation tolerance in mice. *J. Clin. Invest.* 120(7):2486–2496; 2010.
15. Haviernik, P.; Zhang, Y.; Bunting, K. D. Retroviral transduction of murine hematopoietic stem cells. *Methods Mol. Biol.* 430:229–241; 2008.
16. Highfill, S. L.; Rodriguez, P. C.; Zhou, Q.; Goetz, C. A.; Koehn, B. H.; Veenstra, R.; Taylor, P. A.; Panoskaltis-Mortari, A.; Serody, J. S.; Munn, D. H.; Tolar, J.; Ochoa, A. C.; Blazar, B. R. Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. *Blood* 116(25):5738–5747; 2010.
17. Iiyama, M.; Kakihana, K.; Kurosu, T.; Miura, O. Reactive oxygen species generated by hematopoietic cytokines play roles in activation of receptor-mediated signaling and in cell cycle progression. *Cell. Signal.* 18(2):174–182; 2006.
18. Jacobsen, S. E.; Okkenhaug, C.; Myklebust, J.; Veiby, O. P.; Lyman, S. D. The FLT3 ligand potently and directly stimulates the growth and expansion of primitive murine bone marrow progenitor cells in vitro: Synergistic interactions with interleukin (IL) 11, IL-12, and other hematopoietic growth factors. *J. Exp. Med.* 181(4):1357–1363; 1995.
19. Kennedy, B. C.; Shimato, S.; Anderson, R. C.; Bruce, J. N. Defining the mechanisms of CD8 T-cell tumor tolerance. *Immunotherapy* 3(1):23–26; 2011.
20. Kittler, E. L.; Peters, S. O.; Crittenden, R. B.; Debatis, M. E.; Ramshaw, H. S.; Stewart, F. M.; Quesenberry, P. J. Cytokine-facilitated transduction leads to low-level engraftment in nonablated hosts. *Blood* 90(2):865–872; 1997.
21. Kusmartsev, S.; Nagaraj, S.; Gabrilovich, D. I. Tumor-associated CD8<sup>+</sup> T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells. *J. Immunol.* 175(7):4583–4592; 2005.
22. Lechner, M. G.; Liebertz, D. J.; Epstein, A. L. Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol.* 185(4):2273–2284; 2010.
23. Lechner, M. G.; Megiel, C.; Russell, S. M.; Bingham, B.; Arger, N.; Woo, T.; Epstein, A. L. Functional characterization of human Cd33<sup>+</sup> and Cd11b<sup>+</sup> myeloid-derived suppressor cell subsets induced from peripheral blood mononuclear cells co-cultured with a diverse set of human tumor cell lines. *J. Transl. Med.* 9:90; 2011.
24. Luskey, B. D.; Rosenblatt, M.; Zsebo, K.; Williams, D. A. Stem cell factor, interleukin-3, and interleukin-6 promote retroviral-mediated gene transfer into murine hematopoietic stem cells. *Blood* 80(2):396–402; 1992.
25. MacDonald, K. P.; Rowe, V.; Clouston, A. D.; Welply, J. K.; Kuns, R. D.; Ferrara, J. L.; Thomas, R.; Hill, G. R. Cytokine expanded myeloid precursors function as regulatory antigen-presenting cells and promote tolerance through IL-10-producing regulatory T cells. *J. Immunol.* 174(4):1841–1850; 2005.
26. Maggini, J.; Mirkin, G.; Bognanni, I.; Holmberg, J.; Piazzon, I. M.; Nepomnaschy, I.; Costa, H.; Canones, C.; Raiden, S.; Vermeulen, M.; Geffner, J. R. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One* 5(2):e9252; 2010.
27. Marigo, I.; Bosio, E.; Solito, S.; Mesa, C.; Fernandez, A.; Dolcetti, L.; Ugel, S.; Sonda, N.; Bicciato, S.; Falisi, E.; Calabrese, F.; Basso, G.; Zanovello, P.; Cozzi, E.; Mandruzzato, S.; Bronte, V. Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBP $\beta$  transcription factor. *Immunity* 32(6):790–802; 2010.
28. Moline-Velazquez, V.; Cuervo, H.; Vila-Del Sol, V.; Ortega, M. C.; Clemente, D.; de Castro, F. Myeloid-derived suppressor cells limit the inflammation by promoting T lymphocyte apoptosis in the spinal cord of a murine model of multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 21(6):678–691; 2011.
29. Movahedi, K.; Williams, M.; Van den Bossche, J.; Van den Bergh, R.; Gysemans, C.; Beschin, A.; De Baetselier, P.; Van Ginderachter, J. A. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* 111(8):4233–4244; 2008.
30. Nagaraj, S.; Gabrilovich, D. I. Regulation of suppressive function of myeloid-derived suppressor cells by CD4(+) T cells. *Semin. Cancer Biol.* 22(4):282–288; 2012.
31. Nagaraj, S.; Gupta, K.; Pisarev, V.; Kinarsky, L.; Sherman, S.; Kang, L.; Herber, D. L.; Schneck, J.; Gabrilovich, D. I. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8<sup>+</sup> T cell tolerance in cancer. *Nat. Med.* 13(7):828–835; 2007.
32. Nagaraj, S.; Nelson, A.; Youn, J. I.; Cheng, P.; Quiceno, D.; Gabrilovich, D. I. Antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells regulate function of myeloid-derived suppressor cells in cancer via retrograde MHC class II signaling. *Cancer Res.* 72(4):928–938; 2012.
33. Nagaraj, S.; Schrum, A. G.; Cho, H. I.; Celis, E.; Gabrilovich, D. I. Mechanism of T cell tolerance induced by myeloid-derived suppressor cells. *J. Immunol.* 184(6):3106–3116; 2010.
34. Nefedova, Y.; Huang, M.; Kusmartsev, S.; Bhattacharya, R.; Cheng, P.; Salup, R.; Jove, R.; Gabrilovich, D. Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *J. Immunol.* 172(1):464–474; 2004.
35. Pan, P. Y.; Ma, G.; Weber, K. J.; Ozao-Choy, J.; Wang, G.; Yin, B.; Divino, C. M.; Chen, S. H. Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer Res.* 70(1):99–108; 2010.
36. Pan, P. Y.; Wang, G. X.; Yin, B.; Ozao, J.; Ku, T.; Divino, C. M.; Chen, S. H. Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: Modulation of myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem-cell factor function. *Blood* 111(1):219–228; 2008.
37. Puig, T.; Kadar, E.; Limon, A.; Cancelas, J. A.; Eixarch, H.; Luquin, L.; Garcia, M.; Barquinero, J. Myeloablation enhances engraftment of transduced murine hematopoietic cells, but does not influence long-term expression of the transgene. *Gene Ther.* 9(21):1472–1479; 2002.
38. Rodrigues, J. C.; Gonzalez, G. C.; Zhang, L.; Ibrahim, G.; Kelly, J. J.; Gustafson, M. P.; Lin, Y.; Dietz, A. B.; Forsyth, P. A.; Yong, V. W.; Parney, I. F. Normal human monocytes exposed to glioma cells acquire myeloid-derived suppressor cell-like properties. *Neuro Oncol.* 12(4):351–365; 2010.
39. Rossner, S.; Voigtlander, C.; Wiethe, C.; Hanig, J.; Seifarth, C.; Lutz, M. B. Myeloid dendritic cell precursors generated from bone marrow suppress T cell responses via cell contact and nitric oxide production in vitro. *Eur. J. Immunol.* 35(12):3533–3544; 2005.

40. Serafini, P.; Mgebroff, S.; Noonan, K.; Borrello, I. Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer Res.* 68(13):5439–5449; 2008.
41. Shi, C. Recent progress toward understanding the physiological function of bone marrow mesenchymal stem cells. *Immunology* 136(2):133–138; 2012.
42. Solito, S.; Bronte, V.; Mandruzzato, S. Antigen specificity of immune suppression by myeloid-derived suppressor cells. *J. Leukoc. Biol.* 90(1):31–36; 2011.
43. Solito, S.; Falisi, E.; Diaz-Montero, C. M.; Doni, A.; Pinton, L.; Rosato, A.; Francescato, S.; Basso, G.; Zanovello, P.; Onicescu, G.; Garrett-Mayer, E.; Montero, A. J.; Bronte, V.; Mandruzzato, S. A human promyelocytic-like population is responsible for the immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells. *Blood* 118(8):2254–2265; 2011.
44. Vincent, J.; Mignot, G.; Chalmin, F.; Ladoire, S.; Bruchard, M.; Chevriaux, A.; Martin, F.; Apetoh, L.; Rebe, C.; Ghiringhelli, F. 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res.* 70(8):3052–3061; 2010.
45. Watts, K. L.; Adair, J.; Kiem, H. P. Hematopoietic stem cell expansion and gene therapy. *Cytherapy* 13(10):1164–1171; 2011.
46. Xiang, X.; Poliakov, A.; Liu, C.; Liu, Y.; Deng, Z. B.; Wang, J.; Cheng, Z.; Shah, S. V.; Wang, G. J.; Zhang, L.; Grizzle, W. E.; Mobley, J.; Zhang, H. G. Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes. *Int. J. Cancer* 124(11):2621–2633; 2009.
47. Yamamoto, Y.; Ishigaki, H.; Ishida, H.; Itoh, Y.; Noda, Y.; Ogasawara, K. Analysis of splenic Gr-1<sup>int</sup> immature myeloid cells in tumor-bearing mice. *Microbiol. Immunol.* 52(1):47–53; 2008.
48. Yin, B.; Ma, G.; Yen, C. Y.; Zhou, Z.; Wang, G. X.; Divino, C. M.; Casares, S.; Chen, S. H.; Yang, W. C.; Pan, P. Y. Myeloid-derived suppressor cells prevent type 1 diabetes in murine models. *J. Immunol.* 185(10):5828–5834; 2010.
49. Youn, J. I.; Gabrilovich, D. I. The biology of myeloid-derived suppressor cells: The blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *Eur. J. Immunol.* 40(11):2969–2975; 2010.
50. Youn, J. I.; Nagaraj, S.; Collazo, M.; Gabrilovich, D. I. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J. Immunol.* 181(8):5791–5802; 2008.
51. Zandstra, P. W.; Conneally, E.; Petzer, A. L.; Piret, J. M.; Eaves, C. J. Cytokine manipulation of primitive human hematopoietic cell self-renewal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(9):4698–4703; 1997.
52. Zhou, Z.; French, D. L.; Ma, G.; Eisenstein, S.; Chen, Y.; Divino, C. M.; Keller, G.; Chen, S. H.; Pan, P. Y. Development and function of myeloid-derived suppressor cells generated from mouse embryonic and hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 28(3):620–632; 2010.
53. Zhu, B.; Bando, Y.; Xiao, S.; Yang, K.; Anderson, A. C.; Kuchroo, V. K.; Khoury, S. J. CD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>hi</sup> suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 179(8):5228–5237; 2007.