

Programa de Doctorado de Medicina
Departamento de Medicina

**Función de las semaforinas 3A y 7A en la
neurorregeneración y en la regulación de la
respuesta inmunitaria en la encefalomielitis
autoinmune experimental**

Tesis doctoral presentada por Ana Gutiérrez Franco para optar al grado de
Doctor

Directores de la tesis:

Dra. Carmen Espejo Dra. Herena Eixarch Prof. Xavier Montalban

Tutor de la tesis:

Prof. Vicenç Fonollosa Pla

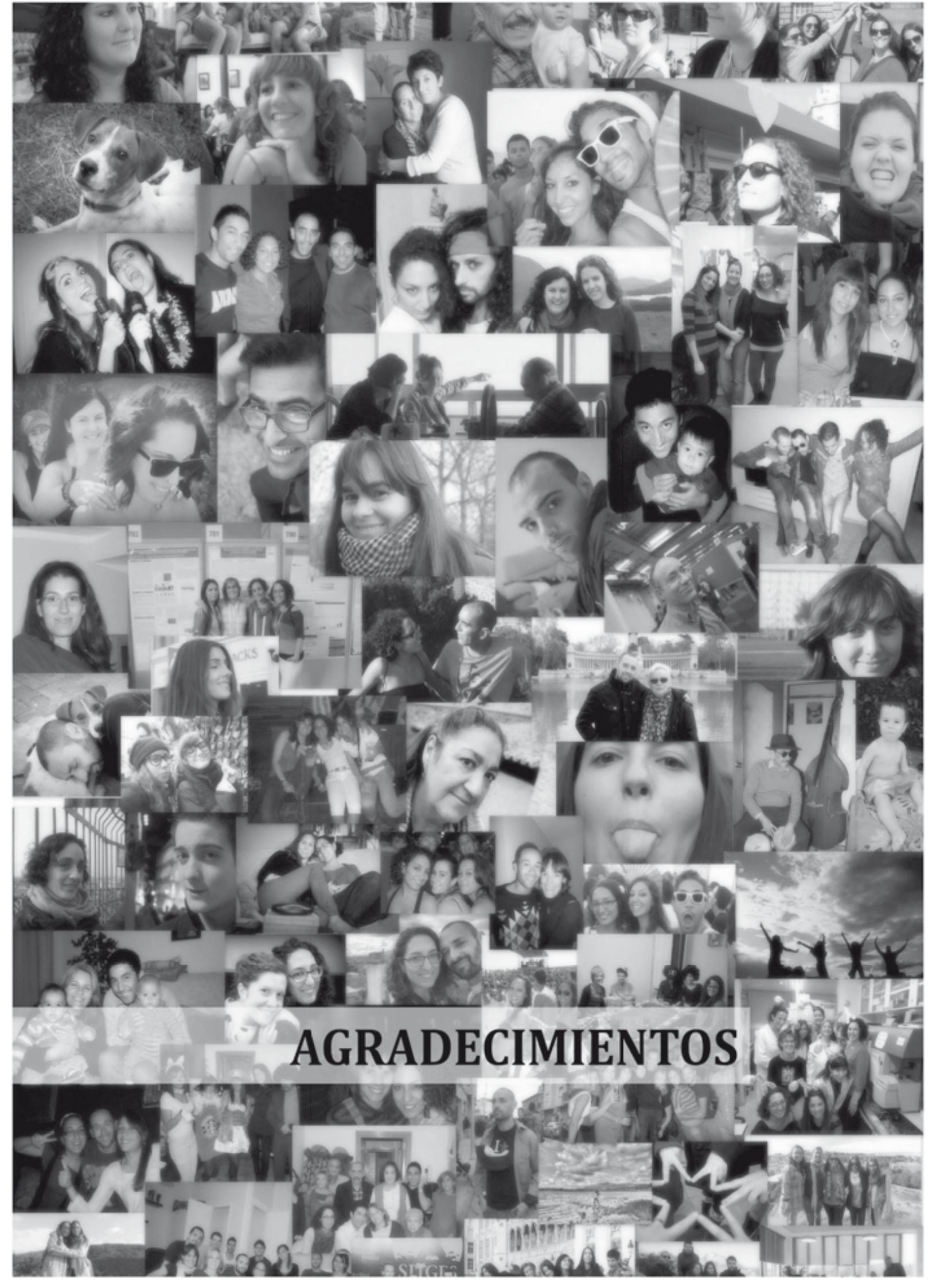
Doctoranda:

Ana Gutiérrez Franco

Barcelona, 2014

“Querer es poder”

Virgilio, Eneida, 5.231



AGRADECIMIENTOS

Hace nueve años comenzó una aventura, mi GRAN AVENTURA. Con toda la ilusión del mundo, y con todo el apoyo de mi familia y mis amigos, hice las maletas y me planté en Barcelona para estudiar biotecnología.

Del mismo modo que elegí estudiar la carrera que iba a cambiar mi vida, es decir, por casualidad, envié un e-mail para informarme sobre una posición de estudiante de doctorado en el campo de la neuroinmunología. Y es que a veces, las mejores decisiones no las tomas, simplemente suceden.

Recuerdo haber querido ser arqueóloga, profesora de matemáticas, pintora, ingeniera, genetista... Siendo biotecnóloga y una vez que podía especializarme, no sabía si hacerlo en el prometedor mundo de la terapia génica, las vacunas o el estudio del cáncer. Sin embargo, siempre me apasionó la neurociencia: cómo podíamos pensar, qué era eso de la memoria, la locura, cómo la interacción entre células podían hacernos sentir, hablar y, en definitiva, organizar todos los procesos que ocurren en nuestro organismo.

Así que cuando empecé en el laboratorio, sin apenas saber nada sobre la esclerosis múltiple, casi no podía creer que me iba a dedicar los siguientes cuatro años a aprender e indagar en el funcionamiento del cerebro y su interacción con el sistema inmune en enfermedades neurodegenerativas.

Aún más difícil era imaginar que estos años fueran a significar otra gran etapa de mi vida, no solo por cumplir uno de mis sueños, sino por conocer a mi compañero de aventuras, y a gente que jamás saldrá de mi vida, que me han ayudado, y con la que he compartido algunas lágrimas, muchas risas, también canciones, barbacoas, viajes, cervezas, mojitos y sobre todo una gran amistad.

A todos vosotros, familia, amigos, pareja, jefes y colegas, empieza el momento de daros ese protagonismo que os merecéis, de deciros que sin vuestra ayuda no estaría en Edimburgo escribiendo las últimas páginas de mi tesis. Habéis sido el apoyo y la determinación que en momentos me ha faltado, habéis sido la ilusión y el ejemplo a seguir, habéis formado sinapsis cuando entraba en degeneración... En definitiva, sois parte de este trabajo y os estoy sinceramente agradecida.

Gracias a mis tres directores de tesis, Carmen Espejo, Herena Eixarch y Xavier Montalban, por darme la oportunidad de formar parte de un equipo multidisciplinar de gran calidad. En especial, gracias a Carmen por su paciencia, por sus consejos, por haber tenido la puerta de su despacho siempre abierta y por haberme inculcado algo de orden o al menos haberlo intentado. Gracias a Herena por haberme enseñado tanto, de citometría, de cultivos, de

revisiones y de artículos. ¡Hemos sufrido mucho juntas! Y gracias a Xavier por ser el motor de un proyecto sin igual, por sus palabras de ánimo constantes, por considerar la formación continuada de su equipo uno de los aspectos clave del éxito y por mantener al paciente como fin único de todos nuestros esfuerzos. Gracias a los tres por haberme enseñado con dedicación y entusiasmo y por haber sacrificado parte de vuestro verano corrigiendo el manuscrito.

Gracias a Carme Costa por ser tan buena profe, por todo lo que me ha enseñado de histopatología, por haber compartido penas, risas y maldiciones por culpa de los anticuerpos, por saltar de alegría conmigo cuando los cultivos decidían no morir y por los momentos en que éramos capaces de arreglar el mundo

Gracias a mis niñas, María José, Ester, Silvia, Laura Negrotto y Marta Fernández. Todas habéis soportado mis malos momentos y también, espero, disfrutado de los buenos. Gracias por vuestros consejos y por haberme dado fuerza y ánimo constante. María José fue mi antecesora y dejó el listón bien alto. Supiste orientarme en mis primeros meses de doctorado y más tarde desde París o desde Can Ruti, siempre has estado a golpe de email para echarme una mano. También nos ha tocado compartir la recta final y sé que nos sentiremos orgullosas de ser las “Chicas Espejo”. Gracias Ester. Me dejas sin palabras. Nuestra relación se ha consolidado día tras día, compartiendo primero cafés, luego sueños, luego bajones, después “subidón subidón”, congresos, ratones, cervezas, secretos, topos, llantos, brotes, abrazos, *papers*, conciertos, karaokes... y un sinfín de momentos. Te admiro y sé que te espera un futuro prometedor. En cualquier caso, ¡siempre seré tu *fan number one* allá donde cantes! Gracias a Silvia por ayudarme siempre que lo he necesitado, por hacer más llevaderos todos los momentos de locura y tensión realizando experimentos interminables con los ratones. Gracias a Laura, quien a pesar de decirle que los argentinos no me caían bien, ha hecho que definitivamente cambie de idea. Gracias por las conversaciones sinceras, por compartir sueños raros, por entenderme en mis locuras, por tu alegría y por reírte de mis pelotudeces. Y gracias a Marta, compañera de despacho, de fatigas, de alegrías, de indecisiones, de ilusiones... Gracias por hacerme reflexionar, por tus abrazos, por acogerme cuando lo necesitaba, gracias por subirme la moral y ver en mí, más de lo que yo pueda imaginar.

Gracias a todos los compañeros de laboratorio con los que he compartido momentos inolvidables, que me han ayudado en el día a día, y me han apoyado para seguir adelante. Gracias por enseñarme todas las técnicas que vosotros domináis y re-orientarme cuando estaba perdida. Gracias a Nico, Luis, Montse M, Sunny, Jennifer, Mireia, Zoraida, Nuria,

Montse T y Laura Navarro. Gracias también a Manuel Comabella, jefe del grupo de laboratorio, por su gran dedicación.

Gracias a todo el equipo del Cemcat por el buen ambiente de trabajo que proporcionan, su profesionalidad y su espíritu colaborador.

Gracias a Elena Martínez Sáez del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitari Vall d'Hebron, por su colaboración en el estudio de las muestras de pacientes con EM y otras enfermedades desmielinizantes.

Gracias a todos los ratones que dieron su vida en este proyecto. Gracias al personal del estabulario, Álex Rojo, Cristina León, Raquel García y Eva Morón, quienes a pesar del acoso sufrido día tras día con mis e-mails, siempre me han ofrecido su ayuda y me han atendido con rapidez. Gracias a Álex por responder a todas mis preguntas y por enseñarme a cuidar mejor de mis ratones.

Gracias a Edu Sarró por aguantar todas mis dudas con los westerns y por compartir momentos estelares en la sala de cultivos.

Gracias a Ari Recasens, otro modelo científico a seguir. Gracias por todo el apoyo que me has dado, ¡incluso estando de vacaciones en Vietnam! Gracias por tener siempre una sonrisa y un abrazo que ofrecer.

Gracias a todos los compañeros del VHIR que conocí en una fiesta de becarios, y se han convertido en parte de mi familia, Jordi, Marcos, Aintzane, Damir, Laia y Mario. Con vosotros cualquier acontecimiento es especial. Así que, ¡vamos a celebrarlo!

No me puedo olvidar de mi círculo favorito, mis niñas de la universidad, Mariaje, Yoli, Teresa, Ana, Belén, Ari y Diana. Gracias Mariaje por todos estos años de amistad, de viajes y de aventuras, por hacerme sentir una “vasca” más a tu lado y por escucharme durante interminables horas. Gracias nenas por haberme dejado entrar al lado oscuro. Juntas hemos crecido, hemos madurado y estoy segura que nos veremos arrugar. Gracias por estar ahí y ayudar a levantarme, gracias por estar ahí y disfrutar de las buenas noticias, ¡Gracias!

Gracias a Ane y a Roi, que a pesar de no tener una relación diaria, me habéis ayudado a superar algunas crisis existenciales. Gracias también a Sarai y Marta Ollé, que después de los años, nos hemos reencontrado en el VHIR y hemos compartido sentimientos encontrados durante el doctorado. Gracias a Yasmina, porque su recuerdo siempre me da fuerzas y me enseñó que lo más importante es no dejar de luchar.

Aunque mi llegada a Barcelona marcó el comienzo de esta gran aventura, nada de esto hubiera sucedido sin mi gente de Madrid. Hemos crecido juntos, nos hemos enfadado, nos hemos querido, pero nunca nos hemos olvidado. Formáis parte de quien soy, vosotros me definís. Gracias a Violeta por ser mi alma gemela, quien entiende mis temores, quien discute mis argumentos, quien me enseña lo que a veces no puedo ver y quien me escucha en todo momento. Gracias a Irene Marida por sus abrazos y su ternura que alivian cualquier situación, por ser sincera y expresiva y por hacer un video que me hace llorar de alegría. Gracias a Rut, Pris, Johanes, Kike, Rubo, Mario e Irene Martín. Gracias a todos por haberme apoyado cuando decidí irme, y por hacer como si nunca lo hubiera hecho cada vez que os vuelvo a ver.

Gracias a Maica por ayudarme y darme ánimos en el último tramo de la tesis, por animarme a venir a Edimburgo a hacer una estancia y por todos los momentazos que hemos pasado de conciertos y festivales.

Gracias Jordi, gracias amor. No quiero imaginar cómo hubiera sido este camino sin tu compañía, sin tu apoyo, sin tus abrazos... Gracias por conocerme mejor que yo y saber qué decir para hacerme sonreír. Me has dado la energía que me faltaba, me has ayudado en la distancia y me has hecho reír hasta cuando lo creía imposible. Sé que superaremos cualquier obstáculo mientras estemos juntos.

Gracias también al inquieto de Byron que me ayudó a desconectar con sus paseos y sus monerías.

Por último, quiero darle las gracias a toda mi familia, a mis padres, Faustino y Lola, por ayudarme a cumplir mis sueños, a mis hermanos Fausto, René y David por enseñarme a luchar cada día por conseguirlos, a mi prima Ana por ser como una hermana y apoyarme en cada decisión, y a mi primo Paco, quien me animó a no tirar la toalla ni a renunciar a la ciencia en uno de los momentos más críticos.

Si has leído los agradecimientos enteros, gracias también a ti. Gracias porque entiendes como yo que cada una de esas personas han hecho que esto sea posible y se merecen un reconocimiento.



PRESENTACIÓN

El trabajo presentado en esta tesis doctoral se ha realizado en el laboratorio de Neuroinmunología Clínica, del Centre d’Esclerosis Múltiple de Catalunya (Cemcat) en el Vall d’Hebron Institut de Recerca (VHIR), Hospital Universitari Vall d’Hebron. Esta tesis doctoral ha estado co-dirigida por la Dra. Carmen Espejo, la Dra. Herena Eixarch y el Prof. Xavier Montalban, Director del Cemcat.

El Cemcat se dedica a la asistencia clínica, la rehabilitación física y cognitiva y a la investigación clínico-básica de la esclerosis múltiple (EM). Cuenta con un equipo multidisciplinar experimentado, formado por clínicos (neurologos, neuropsicólogos, fisioterapeutas, logopeda, terapeuta ocupacional y enfermeras), investigadores básicos (neurologos, biólogos, biotecnólogos, veterinario, bioquímico y farmacéutico), personal de soporte técnico (técnicos de laboratorio) y de gestión de la investigación y la docencia (economista, contable y administrativos). De esta forma el Cemcat desarrolla una atención integral del paciente, lleva a cabo un control diario de la calidad asistencial mediante sesiones clínicas y realiza una investigación clínica y básica de gran calidad, lo que ha hecho que se convierta en un centro de referencia de la EM a nivel nacional e internacional. La investigación del grupo se puede dividir en investigación clínica e investigación básica y tiene como objetivo principal mejorar la calidad de vida del paciente con EM profundizando en el conocimiento de los mecanismos patogénicos de la enfermedad así como en el desarrollo de nuevos abordajes terapéuticos, por lo que podemos considerar que la investigación del Cemcat tiene un marcado carácter translacional.

Este proyecto de investigación se engloba dentro de la línea de investigación “Búsqueda de nuevas dianas y/o abordajes terapéuticos para la EM”. Los tratamientos actuales para los pacientes con EM están basados principalmente en la modulación de la respuesta inmune. Sin embargo, los pacientes con formas progresivas no pueden beneficiarse de estos fármacos ya que se encuentran en un estadio de la enfermedad en la que predomina la neurodegeneración. El desafío actual es identificar dianas terapéuticas que fomenten la neorregeneración a la vez que limiten la respuesta inmune. Con este objetivo, surgió la propuesta de estudiar el papel de las semaforinas 3A y 7A en un modelo animal de EM, al tratarse

de moléculas que podrían estar interviniendo tanto en procesos neurodegenerativos como en la respuesta inmune que acontecen en la EM.

En primer lugar se caracterizó la expresión de ambas semaforinas y sus receptores en lesiones de pacientes con EM. Para este fin, se realizó una colaboración con la Dr. Elena Martínez Sáez del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitari Vall d'Hebron. Al observar un aumento en la expresión de estas semaforinas relacionado con el grado de la actividad inflamatoria de la lesión, se planteó describir la expresión de las mismas tanto en el sistema nervioso central como en el sistema inmune en un modelo animal de EM, la encefalomielitis autoinmune experimental, observando que los cambios de expresión de estas proteínas podrían sugerir una función relevante en el desarrollo y/o curso clínico de la enfermedad.

Posteriormente, y dado que la regulación de la semaforina 7A parecía tener más opciones como posible diana terapéutica en la EM y que las herramientas para el estudio de la sema3A *in vivo* no estaban optimizadas, se estudió la función de la semaforina 7A en la EAE. Para ello se realizaron estudios *in vivo* con ratones deficientes en esta proteína a los que se les indujo la EAE. Se estudió el curso clínico, la histopatología y la respuesta inmune de estos animales en comparación con ratones control.

Los resultados presentados en esta tesis han dado lugar a tres artículos que actualmente están en revisión para su publicación en revistas internacionales. Además se ha publicado una revisión sobre el tema de estudio: Eixarch H, Gutiérrez-Franco A, Montalban X, Espejo C. *Semaphorins 3A and 7A: potential immune and neuroregenerative targets in multiple sclerosis*. Trends Mol Med. 2013; 19 (3): 157–64.

Este proyecto ha sido financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad (PS09/01180). Ana Gutiérrez Franco ha sido financiada por el programa PFIS del Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad (FI10/00456).



ÍNDICE

ABREVIATURAS	21
INTRODUCCIÓN	27
1. Esclerosis múltiple.....	29
1.1. Etiología	29
1.2. Patogenia	31
1.3. Anatomía patológica.....	42
1.4. Tratamientos.....	48
2. Encefalomielitis autoinmune experimental	51
2.1. Inducción de la EAE.....	52
2.2. Curso clínico de la EAE	52
2.3. Histopatología.....	53
3. Semaforinas.....	54
3.1. Receptores de las semaforinas	55
3.2. Semaforinas inmunes	55
3.3. Semaforinas en el sistema nervioso adulto.....	58
3.4. Semaforinas en la EM	60
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	67
MATERIAL Y MÉTODOS	71
1. Muestras de lesiones de pacientes con EM y controles	73
2. Encefalomielitis autoinmune experimental	73
3. Caracterización de la expresión de la sema3A, la sema7A y de sus receptores en el SNC de pacientes con EM y ratones con EAE	80
4. Caracterización de la expresión de la sema3A, la sema7A y de sus receptores en el sistema inmune de ratones con EAE y estudio de la respuesta inmunológica en ratones deficientes en sema7A con EAE	84
5. Análisis estadístico	95
RESULTADOS.....	97
Capítulo 1. Caracterización de la expresión de la sema3A, la sema7A y de sus receptores en lesiones de pacientes con EM.....	97

1. Expresión de la sema3A, la sema7A y sus receptores en diferentes tipos celulares del SNC en la EM	99
2. Expresión de la sema3A, la sema7A y sus receptores en las lesiones de pacientes con EM y controles	99
2.1. Expresión de la sema3A y la Np-1	102
2.2. Expresión de la sema7A, la α 1-integrina y la β 1-integrina	103
Capítulo 2. Caracterización de la sema3A, la sema7A y de sus receptores en la EAE	109
1. Curso clínico e histopatología de la EAE	111
2. Perfil de expresión de la sema3A, la sema7A y de sus receptores en el SNC durante la EAE	112
2.1. La sema3A, la sema7A y sus receptores se expresan en diferentes tipos celulares del SNC	112
2.2. Cambios en la expresión de la sema3A, la sema7A y de sus receptores durante la evolución clínica de la EAE	113
3. La sema3A y la sema7A muestran distintos patrones de expresión después de la inducción de la EAE en las diferentes subpoblaciones celulares del sistema inmune ...	119
3.1. Expresión de la sema3A y sus receptores en el desarrollo de la EAE en las células del sistema inmune	119
3.2. Patrón de expresión de la sema7A y de sus receptores	121
3.3. Expresión génica de la sema3A y la sema7A durante la EAE	123
Capítulo 3. Función de la sema7A en la EAE	125
1. Establecimiento de la colonia de ratones sema7AKO	127
1.1. Animales fundadores y genotipado	127
2. Curso clínico de la EAE en ratones sema7AKO	127
2.1. Los ratones sema7AKO no muestran diferencias en el curso clínico de la EAE respecto a los ratones control con el protocolo estándar establecido en nuestro laboratorio	127
2.2. Relevancia de la dosis de péptido encefalitogénico y de adyuvante en el curso clínico	128
3. Histopatología	135
4. Respuesta inmune en animales sema7AKO	135

4.2. La respuesta proliferativa en ratones sema7AKO es menor que en los ratones WT	135
4.2. Los ratones sema7AKO producen menor cantidad de citocinas proinflamatorias que los ratones WT	137
DISCUSIÓN	139
1. La sema3A como factor inhibidor de la regeneración del SNC y de la activación de la respuesta inmune en la EM/EAE	141
2. La sema7A como posible diana terapéutica para el tratamiento del componente inflamatorio y neurodegenerativo de la EM/EAE	146
3. Implicaciones terapéuticas en la EM.....	155
CONCLUSIONES	159
BIBLIOGRAFÍA	163
APÉNDICE.....	185



ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AI	Infarto agudo
APC	Célula presentadora de antígeno profesional
AR	Artritis reumatoide
ARN	Ácido ribonucleico
B1	Célula B T-independientes
B2	Célula B T-dependientes
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BHE	Barrera hematoencefálica
bp	Pares de bases
BOC	Bandas oligoclonales
Breg/B10	Célula B reguladoras
BSA	Albúmina bovina sérica
Ca ²⁺	Ión de calcio
CAHIA	Crónica activa de alta actividad inflamatoria
CALIA	Crónica activa de baja actividad inflamatoria
CFA	Adyuvante complete de Freund
CI	Crónica inactiva
cpm	Cuentas por minuto
Ct	Ciclo umbral
DAB	3,3'-diaminobencidina
DC	Célula dendrítica
EAE	Encefalomielitis autoinmune experimental
EBV	Virus de Epstein Barr
EM	Esclerosis múltiple
EMPP	Esclerosis múltiple primariamente progresiva
EMRR	Esclerosis múltiple remitente-recurrente
EMSP	Esclerosis múltiple secundariamente progresiva
FBS	Suero bovino fetal
Fe ³⁺	Ión de hierro
GA	Acetato de glatirámero
GFAP	Proteína gliofibrilar ácida
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
GPI	Glicofosfatidilinositol

HE	Hematoxilina y eosina
HLA	Antígeno leucocitario humano
HRP	Peroxidasa de rábano
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
iTreg	Células T reguladoras inducidas
K ⁺	Ión de potasio
KB	Klüver–Barrera
KO	<i>Knockout</i>
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LEA	Lectina del tomate
LES	Lupus eritematoso sistémico
LMP	Leucoencefalopatía multifocal progresiva
LPS	Lipopolisacárido
MBP	Proteína mielínica básica
M-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos
McT	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II
MOG	Glicoproteína mielínica de los oligodendrocitos
Na ⁺	Ión de sodio
NeuN	Proteína nuclear específica de neuronas
NK	Célula <i>natural killer</i>
NKT	Célula T <i>natural killer</i>
NNC	Sin afectación neurológica
NOS	Óxido nítrico sintasa
Np	Neuropilina
ns	No significativo
NT	Neurotrofina
nTreg	Célula T reguladora natural
Olig2	Factor de transcripción de oligodendrocitos
OPC	Célula precursora de oligodendrocito
p.i.	Post-inmunización
PBA-Azida	Tampón fosfato salino con albúmina bovina serica y acida sódica

PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
PHA	Fitohemaglutinina
PLP	Proteína proteolipídica
PLXN	Plexina
PMA	Acetato de forbol miristato
PPIB	Peptidil prolil isomerasa B
qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real
RM	Resonancia magnética
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SB	Sustancia blanca
SBAN	Sustancia blanca de apariencia normal
SD	Desviación estándar
SEM	Error estándar de la media
sema	Semaforina
sema7AKO	Deficiente para sema7A
SF	Suero fisiológico
SG	Sustancia gris
SGAN	Sustancia gris de apariencia normal
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SPF	Libre de patógenos específicos
TBST	Solución salina tamponada con Tris-Cl y 0,1% de <i>Tween20</i>
Tc17	Célula T citotóxica productor de IL-17A
TCD4	Célula T CD4+
TCD8	Célula T CD8+
TCR	Receptor de células T
TGF	Factor de crecimiento transformante
Th	Célula T colaboradora (<i>helper</i>)
TLR	Receptor de tipo <i>Toll</i>
TNF	Factor de necrosis tumoral
Tp	Toxina pertussis
Treg	Célula T reguladora

VLA-4 Antígeno muy tardío-4

WT *Wild type*

Nota: En algunas de las abreviaturas se ha mantenido la nomenclatura en inglés por ser la de uso más habitual



INTRODUCCIÓN

1. Esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica, inflamatoria, desmielinizante y neurodegenerativa del sistema nervioso central (SNC). Aunque su etiología es aún desconocida, se sabe que en su desarrollo intervienen tanto factores genéticos como factores ambientales (Comabella and Khouri, 2012). Es una enfermedad extendida mundialmente, aunque su prevalencia varía según el área geográfica, oscilando en el caso de España entre los 75 y 91 individuos por cada 100.000 habitantes (Aladro *et al.*, 2005; Modrego and Pina, 2003; Otero-Romero *et al.*, 2013). La EM es la segunda causa de discapacidad en jóvenes adultos después de los traumatismos, lo que conlleva un impacto social y económico muy significativo.

La EM se diagnostica en mayor proporción en las mujeres que en los hombres (relación 2–3:1) y se caracteriza por una gran heterogeneidad de formas clínicas–evolutivas siendo la más común la presentación en brotes, denominada como EM remitente–recurrente (EMRR), que se caracteriza por episodios o brotes clínicos en los que se manifiestan los síntomas de la enfermedad relacionados con procesos inflamatorios activos y que están separados en el tiempo por un periodo de remisión parcial o total de los síntomas (Lublin *et al.*, 2014). Tras 10 años de evolución de la enfermedad, aproximadamente un 50% de estos pacientes desarrollan un curso progresivo denominado secundariamente progresiva (EMSP) (Giovannoni, 2004). La EM primariamente progresiva (EMPP) se define por la manifestación de un deterioro neurológico funcional progresivo desde el debut de la enfermedad sin padecer brotes clínicos. Se diagnostica en un 10–20% de los pacientes y normalmente son mayores de 40 años (Miller and Leary, 2007).

1.1. Etiología

La causa de la EM se desconoce pero se ha descrito que en el desarrollo de la misma intervienen tanto factores genéticos como ambientales. Durante las últimas décadas se ha realizado un esfuerzo muy grande para identificar los genes que confieren susceptibilidad a padecer la EM. Los resultados obtenidos evidencian que el sistema inmune juega un papel relevante en esta enfermedad. En este sentido, diferentes haplotipos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC–

II), en particular el antígeno leucocitario humano (HLA)-DR y HLA-DQ se han asociado con la susceptibilidad a desarrollar la EM (Compston and Coles, 2008; Hoppenbrouwers and Hintzen, 2011). Entre ellos, los alelos DRB1*1501 y DRB5*0101 están asociados con todas las presentaciones clínicas de la EM sin influencia de la región geográfica. En estas regiones cromosómicas se encuentran algunos genes relacionados con la respuesta inmune, como el receptor de la interleucina (IL)-17 (Oksenberg and Hauser, 2010). Además, se han identificado otros genes fuera de la región HLA que confieren susceptibilidad a la EM, como los que codifican los receptores de la IL-2 e IL-7, y que están implicados en la regulación de la respuesta inmune (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium *et al.*, 2007). También se ha descrito que el gen que codifica Notch4, una molécula de señalización relacionada con la formación de la mielina y que además tiene funciones inmunes, presenta cierta asociación con el desarrollo de la EM (Duvefelt *et al.*, 2004). El hecho de que la EM se manifieste en mayor proporción en mujeres que en hombres, sugiere que los niveles hormonales son también factores de riesgo. Aún se desconoce de qué manera las hormonas sexuales influyen en la susceptibilidad a la EM, pero se han descrito efectos en la inducción de la secreción de citocinas pro-inflamatorias mediada por estrógenos (Bove and Chitnis, 2014).

Estudios epidemiológicos indican que también los factores ambientales pueden contribuir en el inicio de la enfermedad. La distribución dispar de la prevalencia de la EM en el hemisferio norte y sur ha hecho pensar que la exposición a la luz solar podría ejercer algún efecto sobre las células inmunes (Hayes, 2000). Partiendo de la base que la síntesis de vitamina D se induce con la exposición solar, se ha descrito que los niveles de vitamina D en pacientes con EM sería un predictor del riesgo a desarrollar la enfermedad, otorgando un efecto protector a la vitamina D (Ascherio *et al.*, 2010; Munger *et al.*, 2006). Otro factor de riesgo importante en el desarrollo de la EM es el tabaquismo (Handel *et al.*, 2011).

Existen evidencias de que la exposición e infección por ciertos patógenos también podría predisponer al desarrollo de la EM. Se ha demostrado que en muchas ocasiones los brotes clínicos están precedidos de una infección vírica (Sibley *et al.*, 1985). Gracias a experimentos realizados en un modelo animal de la EM, la

encefalomieltitis autoinmune experimental (EAE), se pudo confirmar que cuando los animales se mantenían en condiciones libres de patógenos (SPF) no presentaban signos clínicos de la enfermedad, mientras que los ratones que se mantuvieron en condiciones normales sí que desarrollaban la EAE (Goverman *et al.*, 1993). Se ha descrito que el 100% de los pacientes con EM son seropositivos para el virus de Epstein Barr (EBV) y que su reactivación se suele correlacionar con la presentación de brotes (Wandinger *et al.*, 2000). Además, las personas que terminan desarrollando EM tienen niveles incrementados de inmunoglobulinas (Ig)G frente al antígeno nuclear del EBV antes, incluso, de presentar los primeros signos clínicos de la EM (Sundstrom *et al.*, 2004). La infección vírica podría ser la responsable de la activación de las células autorreactivas mediante mecanismos de mimetismo molecular y/o activación secundaria (del término inglés “*bystander activation*”), lo que podría iniciar la respuesta autoinmune frente a antígenos mielínicos que acontece en la EM (Croxford *et al.*, 2002; Sospedra and Martin, 2005). Por todo ello, los agentes infecciosos podrían inducir o contribuir al desarrollo de la EM (Ascherio and Munger, 2007).

1.2. Patogenia

El concepto de que la EM es una enfermedad autoinmune tiene su origen en los experimentos realizados por Rivers y colaboradores en los que reprodujeron una enfermedad muy similar a la EM al inyectar un homogeneizado del SNC en primates para estudiar las complicaciones que se habían observado tras la vacunación contra el virus de la rabia (Rivers *et al.*, 1933). Muchos años después, se siguen usando modelos animales en los que se induce experimentalmente la enfermedad inyectando proteínas o péptidos de la mielina.

La patogenia de la EM se caracteriza por una serie de procesos autoinmunes que ocurren en el SNC. De forma natural existen células T autorreactivas circulantes que una vez activadas en la periferia, pueden atravesar la BHE y migrar al SNC donde son re-activadas de manera local dando lugar a la proliferación de éstas y a la producción de citocinas pro-inflamatorias que activan a las células de la microglía y a los astrocitos y que, además, favorecen el reclutamiento de otras poblaciones de células inmunes (Hartung *et al.*, 2014). El resultado final son lesiones en el SNC

que presentan infiltración de células inflamatorias (principalmente linfocitos T y macrófagos), desmielinización de la sustancia blanca, pérdida de oligodendrocitos, daño axonal y gliosis (Miller, 2012).

1.2.1. Activación de células T en periferia

Aunque aún sigue debatiéndose qué mecanismos median la activación de los linfocitos T en periferia, existen dos hipótesis que explicarían de qué manera la infección por ciertos patógenos podría participar en la misma. La más aceptada es el mimetismo molecular, que implicaría que un antígeno procedente de un patógeno compartiría algún epítopo de un antígeno propio, es decir, que tendría estructuras idénticas o muy similares, y ello haría que las células T y B autorreactivas circulantes se activaran en periferia por reactividad cruzada (Figura 1a). Otra hipótesis sería la de la activación secundaria (*bystander activation*) de los linfocitos T autorreactivos. Tras una infección por un patógeno, tanto las células de la inmunidad innata como de la inmunidad adquirida, se activarían en respuesta a la infección creando un microambiente pro-inflamatorio (citocinas, señales de peligro, superantígenos, etc.) que favorecería la activación de las células T autorreactivas (Fujinami *et al.*, 2006) (Figura 1b).

Los mecanismos que posee el sistema inmune innato para mantener la homeostasis del organismo y protegerlo de los patógenos microbiales o víricos también pueden causar, en determinadas circunstancias, respuestas de tipo autoinmune (Sospedra and Martin, 2005). Los receptores de tipo *Toll* (TLR) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos pueden desencadenar la pérdida de tolerancia periférica hacia los antígenos propios durante infecciones crónicas y así generar células T autorreactivas (Waldner *et al.*, 2004).

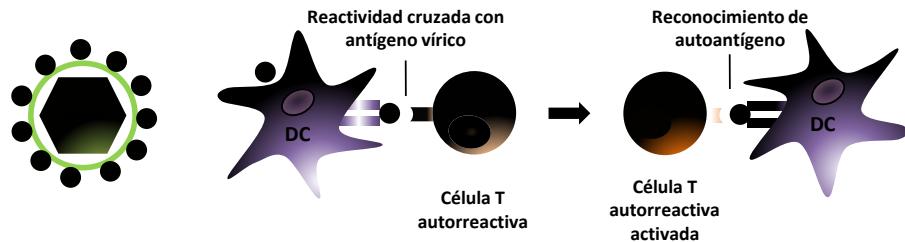
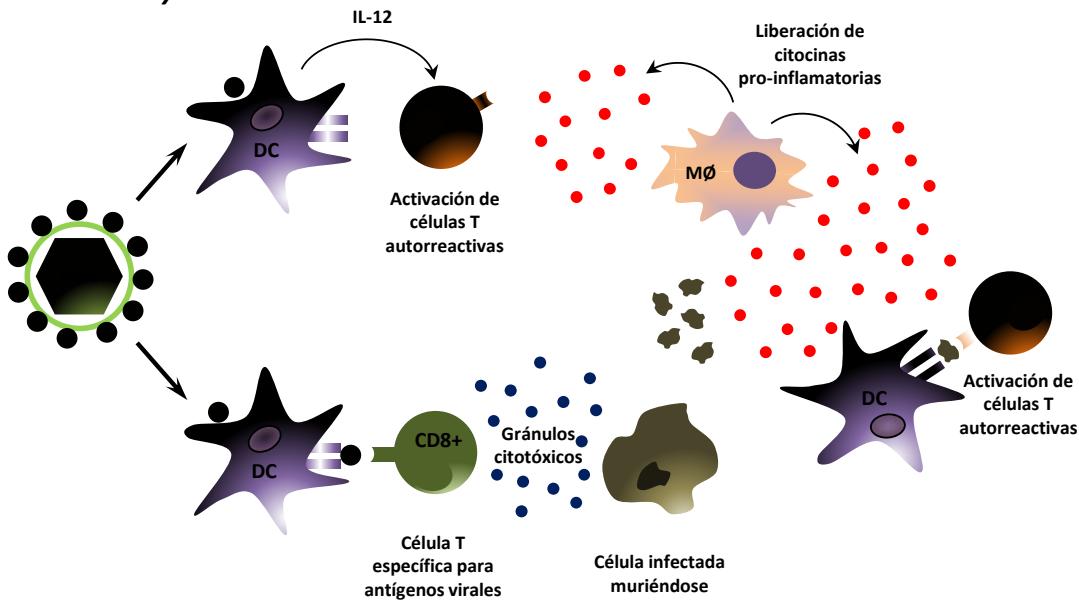
a. Mimetismo molecular**b. Activación bystander**

Figura 1. Posibles mecanismos de activación de los linfocitos T en la periferia. (a) Estructuras similares entre componentes de agentes infecciosos y autoantígenos facilitaría la reactividad cruzada y mediarían la activación de células que reconocen antígenos propios. (b) Tras la infección por un patógeno, la respuesta inmune que se desencadena para combatir esta infección podría, secundariamente, activar las células T autorreactivas y así desarrollar una respuesta autoinmune. DC: célula dendrítica; CD8+: célula T CD8+ citotóxica; MØ: macrófago.

1.2.2. Infiltración de las células inflamatorias en el SNC

Una vez activadas, las células T CD4+ colaboradores (Th) autorreactivas producen citocinas pro-inflamatorias y expresan moléculas de adhesión celular como el antígeno muy tardío-4 (VLA-4) o el antígeno de función linfocitaria de tipo 1, que facilitan la infiltración de las células inmunes a través de la BHE mediante la interacción con moléculas de adhesión intercelulares y con moléculas de adhesión de células del endotelio vascular. En este proceso también intervienen otras moléculas relevantes como las metaloproteinasa, que degradan la matriz extracelular (Del Zoppo *et al.*, 2006) y las quimiocinas (como CCL19 y CCL20) (Engelhardt and Ransohoff, 2012; Krumbholz *et al.*, 2007).

1.2.3. Respuesta inflamatoria y deterioro del SNC

Una vez en el parénquima nervioso, las células T CD4+ autorreactivas son capaces de activar las células residentes del SNC como la microglía y los astrocitos, que a su vez ejercen de células presentadoras de antígeno profesionales (APC) y reactivan a las células T CD4+ infiltrantes. De este modo, se inicia una respuesta autoinmune que favorece el reclutamiento de otras poblaciones de células inmunes como las células T CD8+ citotóxicas, las células B y los macrófagos. La producción de citocinas pro-inflamatorias como el interferón (IFN)- γ , el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , la IL-17 y la IL-1 β así como la producción de sustancias neurotóxicas y enzimas proteolíticas producidas por las células citotóxicas y los macrófagos, median el daño que sufren los oligodendrocitos y las neuronas (Figura 2).

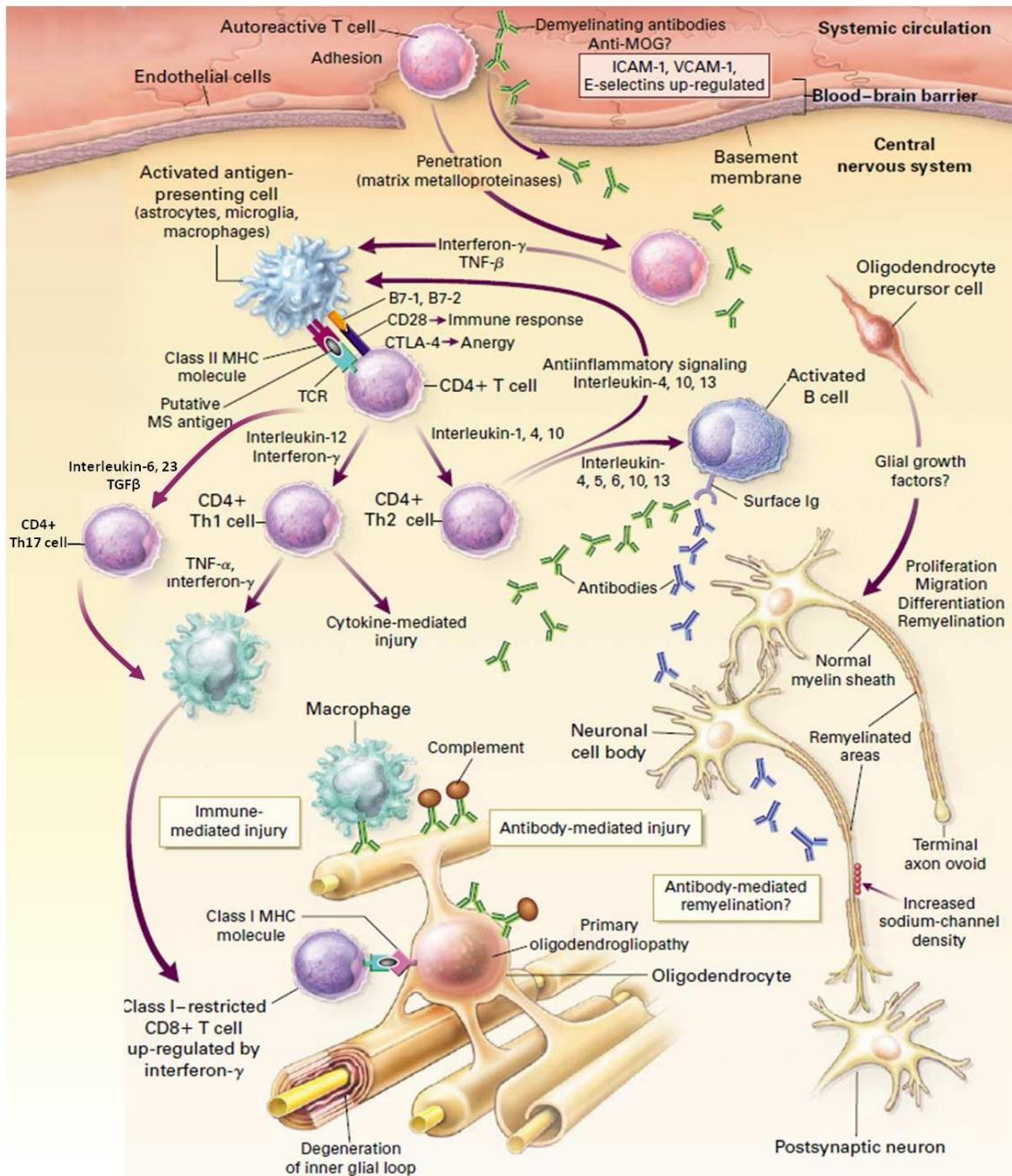


Figura 2. Esquema ilustrativo de la inmunopatogenia de la EM. Tras la activación de células T autorreactivas en periferia, un aumento en la permeabilidad vascular de la BHE les facilita la entrada al SNC. Las células T activadas producen citocinas que activan la microglía y los astrocitos de forma que pueden ejercer como APC y re-estimular a las células T autorreactivas que se diferencian hacia los perfiles pro-inflamatorios Th1 y Th17. Éstas liberan citocinas que promueven los mecanismos efectores que median la degeneración que sufren los oligodendrocitos y las neuronas. Otros tipos celulares, como las células T CD8+ o los macrófagos pueden provocar daño en los oligodendrocitos mediante la activación del complemento o la liberación de sustancias que generan un microambiente pro-inflamatorio y neurodegenerativo. La activación de las células B genera la liberación de auto-anticuerpos que reaccionan con componentes de la vaina de mielina alterando las concentraciones iónicas de sodio (Na^+) y calcio (Ca^{2+}) y deteriorando el impulso nervioso produciendo así los síntomas neurológicos. Figura adaptada de (Noseworthy *et al.*, 2000).

Un estudio realizado en la EAE, sugiere que solo las células Th1 podrían acceder al SNC y una vez allí, iniciarían el reclutamiento de las células Th17 (O'Connor *et al.*, 2008). Sin embargo, estudios *in vitro* sugieren que las células Th17 pueden atravesar la BHE más eficientemente que otras células T (Kebir *et al.*, 2007). En cualquier caso, ambas subpoblaciones celulares producen citocinas que contribuyen a la inflamación del SNC. La IL-17 se detecta en las lesiones activas de EM (Tzartos *et al.*, 2008) y recientemente se ha descrito que las células gliales NG2+, entre las que se encuentran los precursores de oligodendrocitos (OPC), pero no los oligodendrocitos maduros, son la diana principal de la IL-17 en el SNC. La IL-17 induce una fuerte respuesta inflamatoria en este tipo celular y además inhibe la diferenciación de las OPC y provoca la apoptosis de las que se diferencian a oligodendrocitos maduros (Kang *et al.*, 2013). Las células Th17 también producen el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), que aunque no se conoce con exactitud su función, se piensa que esta citocina induciría la migración y el reclutamiento de los monocitos y de las células dendríticas (DC) al SNC. Además, el GM-CSF actúa de manera autocrina aumentando la síntesis de IL-23, citocina que mantiene la activación y maduración de las células Th17 (El-Behi *et al.*, 2011) y, por tanto, la producción de GM-CSF e IL-17. Gracias a los modelos experimentales de EM, se ha podido demostrar que ratones deficientes en la citocina GM-CSF son resistentes a desarrollar la enfermedad (McQualter *et al.* 2001), mientras que la deficiencia en IFN- γ , su receptor u otras moléculas implicadas en la diferenciación de las células Th1 no inhiben la susceptibilidad de los ratones a la EAE (Gran *et al.*, 2002; Gutcher *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2003). De modo que, en los últimos años, el paradigma en cuanto al tipo celular iniciador de la respuesta autoinmune está en discusión.

Por otro lado, y aunque históricamente la EM se ha considerado una enfermedad mediada por células T CD4+, hay muchas evidencias que conceden un papel importante a las células T CD8+ en la patogenia de la EM. Se sabe que en las lesiones desmielinizantes las células T CD8+ superan en número a las células T CD4+ (Babbe *et al.*, 2000). Además, muestran una amplia expansión oligoclonal tanto en las lesiones como en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y en la sangre periférica (Skulina *et al.*, 2004). Las células T CD8+ también destruyen la mielina

mediante la liberación de perforina y granzima dando como resultado la liberación de otros autoantígenos (Friese and Fugger, 2009) que pueden inducir otras respuestas (auto)inmunes. Además son células que secretan moléculas quimioatrayentes para las células T CD4+ específicas de antígenos mielínicos (Biddison *et al.*, 1998). En la EAE se ha podido corroborar que la transferencia de clones de células T CD8+ activados específicos de antígenos mielínicos inducen la enfermedad (Huseby *et al.*, 2001). También se ha demostrado *in vitro* que estas células citotóxicas podrían participar en el daño axonal observado en las lesiones de EM mediante un ataque directo a las neuronas (Medana *et al.*, 2001). Por otro lado, recientemente se ha descrito que las células T CD8+ productoras de IL-17A (Tc17) están involucradas en el inicio de la enfermedad al facilitar la diferenciación de las células T CD4+ a células Th17 que formarían parte de la primera oleada pro-inflamatoria en el SNC. Además, la presencia de las células Th17 permitiría la migración de las células Tc17 en el reclutamiento posterior de células inflamatorias (Huber *et al.*, 2013). Por tanto, las células T CD8+ citotóxicas jugarían un papel importante en el inicio de la respuesta inmune así como en el deterioro del SNC.

En las lesiones de EM también se ha evidenciado la presencia de células B, de células plasmáticas, de Ig y de complemento (Frohman *et al.*, 2006). Las células B por sí mismas no pueden atravesar la BHE, sin embargo, una vez ha comenzado el proceso inflamatorio son capaces de acceder al SNC (Sospedra and Martin, 2005). Las células B favorecen la neuroinflamación mediante la secreción de citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α y la linfoxina. También actúan como APC y participan de manera directa en los procesos de desmielinización produciendo auto-anticuerpos que atacan a los oligodendrocitos directamente y a través de la activación del complemento (O'Connor *et al.*, 2005). Sobre la especificidad de las Ig presentes en las lesiones existe gran controversia. Se han detectado Ig reactivas contra la proteína mielínica básica (MBP), la glicoproteína mielínica de los oligodendrocitos (MOG) y otras proteínas del SNC (Mirshafiey and Kianiaslani, 2013) así como Ig inespecíficas dispersas por la lesión y por la sustancia blanca de apariencia normal (SBAN), que también pueden encontrarse en tejidos de pacientes con otras afecciones neurológicas (Barnett *et al.*, 2009). Por esta razón, se piensa que estas Ig podrían aparecer después de un daño sufrido

en la sustancia blanca sin ser un hecho exclusivo de la activación de las células B en la EM. Aunque se desconoce su papel en la patogenia de la EM, se cree que las Ig podrían tener gran importancia ya que más del 90% de los pacientes muestran producción intratecal de IgG, comúnmente conocido como presencia de bandas oligoclonales (BOC) en el LCR. La ausencia de éstas está asociada con un mejor pronóstico de la enfermedad (Avasarala *et al.*, 2001). También se ha estudiado la presencia de BOC de IgM observando que aquellos pacientes que las presentan, en especial los que presentan IgM específicas frente a lípidos de la mielina, tienen un curso más agresivo de la enfermedad (Villar *et al.*, 2005). Además, también se ha descrito que la presencia de BOC de IgM podría estar asociada a una mala respuesta al tratamiento con IFN-β (Bosca *et al.*, 2010).

Los mastocitos son células que durante reacciones alérgicas liberan múltiples mediadores inflamatorios. En la EM no se conoce con exactitud qué papel desempeñan pero su elevada presencia en las lesiones desmielinizantes (Olsson, 1974), indicaría que favorecen el tráfico linfocitario a través de la BHE y que participan en la destrucción de los oligodendrocitos y las neuronas (Costanza *et al.*, 2012).

1.2.4. Mecanismos reguladores

Se conoce que hay un aumento en el nivel de citocinas anti-inflamatorias en el suero de pacientes que se encuentran en fase de remisión así como un aumento en la SBAN de la expresión de genes que están relacionados con mecanismos protectores y anti-inflamatorios (Zeis *et al.*, 2008). Las células T de tipo Th2, las células T reguladoras (Treg), las células *Natural Killer* (NK) así como las células T CD8+ reguladoras y las células B reguladoras (Breg) son los tipos celulares que median los mecanismos moduladores de la respuesta inmune (Buc, 2013; Ries *et al.*, 2014; Sinha *et al.*, 2014).

Las células Treg tienen un rol principal en la regulación de los procesos inmunes ejerciendo una tolerancia dominante o activa que impide la activación de las células T y B autorreactivas o inhibiendo su actividad efectora mediante la síntesis de citocinas inmunosupresoras (Lan *et al.*, 2005). Las células Treg se dividen en células reguladoras naturales (nTreg) o inducidas (iTreg). Las nTreg, diferenciadas

en el timo, no responden frente a un estímulo concreto ni producen IL-2, sin embargo son capaces de regular la actividad de las células T, B, NK, células NKT y DC mediante la producción de citocinas inmunosupresoras como la IL-10, el factor de crecimiento transformante (TGF- β) o la IL-35 (Shevach, 2009). Las iTreg se diferencian en periferia a partir de células T CD4+ vírgenes durante la respuesta inmune. La presencia de células Treg defectivas o niveles bajos de estas células podría contribuir a la patogenia de la EM (Buc, 2013). En esta línea se ha estudiado, en el modelo animal de la EM, tanto el efecto de la depleción de este tipo celular, que resultó en un curso clínico muy severo de la EAE, como la transferencia de células Treg que redujo la gravedad de la enfermedad (Kohm *et al.*, 2002). De este modo, las células Treg tienen un papel importante en el desarrollo de la enfermedad, al menos en modelos de EAE.

En cuanto a las células NK se ha descrito un descenso de las mismas en pacientes con EM tanto en periferia, como en las lesiones o en el LCR respecto a pacientes con otras afecciones neurológicas inflamatorias (Weber *et al.*, 1987). Se piensa que su función podría ser inmunorreguladora al producir citocinas anti-inflamatorias como la IL-5, la IL-13 y el TGF- β aunque no queda clara su relación con la inmunopatogenia de la EM, ya que también puede exacerbar el daño tisular mediante su actividad citolítica y la activación de las células T y células B (Hernandez-Pedro *et al.*, 2013).

Las células B que poseen capacidad inmunosupresora se han clasificado como células Breg o B10 (Vitale *et al.*, 2010) aunque hasta el momento solo se han podido caracterizar en ratón. Sin embargo, se ha demostrado que limitan la respuesta de las células T CD4+ mediante la secreción de IL-10 (Fillatreau *et al.*, 2002).

1.2.5. Otros mecanismos patogénicos implicados en la formación de la lesión

Los mecanismos que contribuyen a la progresión de la lesión en la EM son muy variados. Como ya se ha comentado, los anticuerpos específicos que reconocen componentes de la mielina o del axón (Berger *et al.*, 2003; Brickshawana *et al.*, 2014), las células T CD8+ citotóxicas (Medana *et al.*, 2001; Neumann *et al.*, 2002)

y la liberación de citocinas pro-inflamatorias y proteasas por la microglía/macrófagos (Smith and Lassmann, 2002) serían otros mecanismos inmunes que contribuirían a la formación de lesiones en el SNC de pacientes con EM.

Otros mediadores del deterioro en lesiones de EM, son los depósitos de ácido hialurónico que al ser degradados interaccionan con los receptores TLR2 presentes en OPC e inhiben su maduración. De este modo, el sistema inmune innato también juega un papel relevante en la inhibición de la remielinización (Sloane *et al.*, 2010).

En los últimos años se está profundizando en el estudio de los cambios iónicos y energéticos que sufre la neurona debido a la desmielinización de los axones. Los canales de sodio (Na^+) se redistribuyen para restaurar el potencial de acción de la membrana, generando un alto consumo de ATP y un aumento intracelular de la concentración de Na^+ que provoca la entrada masiva de calcio (Ca^{2+}) en el interior de la neurona causando la producción de enzimas que median la degeneración axonal (Craner *et al.*, 2003, 2004). El fallo mitocondrial también produce deficiencia energética, cambios en la homeostasis del intercambio de iones y producción de radicales libres que podrían desencadenar la muerte de la neurona (Trapp and Stys, 2009). También se ha descrito recientemente que el hierro se acumula a lo largo de la vida en el interior de los oligodendrocitos.

Sin embargo, en pacientes de EM con lesiones activas, el hierro se libera al espacio extracelular cuando los oligodendrocitos se deterioran produciendo daño oxidativo (Hamelner *et al.*, 2013) y es incorporado por la microglía en los bordes de las lesiones indicando, posiblemente, que se trata de una lesión inflamatoria crónica (Bagnato *et al.*, 2011). Este mecanismo podría estar vinculado a pacientes de edad avanzada que cursan una EM progresiva debido a que la acumulación de Fe^{3+} por parte del organismo es dependiente de la edad (Hallgren and Sourander, 1958). Todo ello hace pensar que el daño oxidativo generado por los cambios en la homeostasis iónica podrían estar involucrados en los procesos de desmielinización y neurodegeneración que acontecen en la EM (Figura 3).

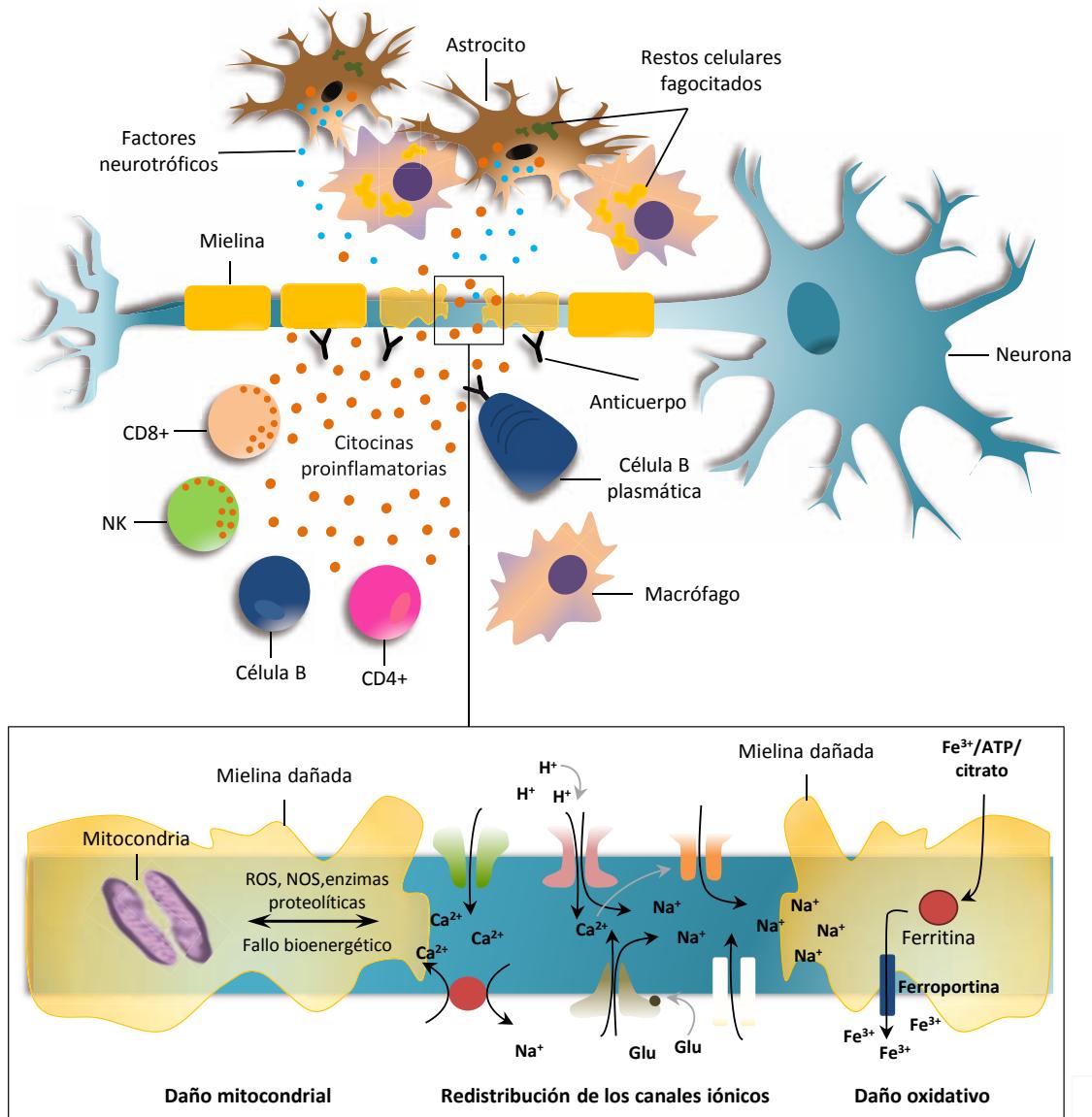


Figura 3. Mecanismos neuropatogénicos que inducen la muerte de los oligodendrocitos y el daño axonal. Las células del sistema inmune liberan al medio citocinas pro-inflamatorias que junto con la activación del complemento, mediante anticuerpos específicos, destruyen la mielina. Tanto los macrófagos como los astrocitos eliminan los restos celulares. Los astrocitos también producen citocinas pro-inflamatorias, liberan factores neurotróficos y forman la cicatriz glial. La pérdida de mielina alrededor de los nódulos de Ranvier provoca que haya una redistribución de los canales iónicos sobre el axón. Sin embargo, la acumulación intra-axonal de iones de Na^+ y Ca^{2+} activa enzimas proteolíticas y produce sustancias reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico sintasa (NOS) que median el daño mitocondrial y por consiguiente el deterioro bioenergético de la célula. El daño oxidativo mediado por hierro (Fe^{3+}) se da al disminuir los niveles de hierro intracelular. Los iones de hierro pueden entrar en las células al combinarse con el complejo citrato/ATP. Una vez en el interior de la célula puede ser usado directamente, o almacenado al unirse con la proteína ferritina. La exportación hacia el exterior está controlada por la proteína intramembrana ferroportina. Glu: Glutamato.

Por último y como consecuencia del deterioro de las células gliales, cabe pensar que la ausencia de factores tróficos procedentes de astrocitos, microglía y oligodendrocitos podría contribuir de manera sustancial al deterioro de los axones desmielinizados de forma permanente (Loeb, 2007).

1.3. Anatomía patológica

Los hallazgos en biopsias y/o necropsias de pacientes con EM han demostrado que los cambios que se dan en el SNC durante el curso de la enfermedad están relacionados con el desarrollo y la progresión de la misma (Lucchinetti *et al.*, 2000). Los hallazgos histopatológicos que caracterizan a la EM son la inflamación, la desmielinización, la gliosis reactiva y la pérdida de oligodendrocitos y de axones (Figura 4). La remielinización de las lesiones puede darse (Prineas *et al.*, 1984) y se piensa que estaría asociado a la recuperación de los síntomas clínicos.

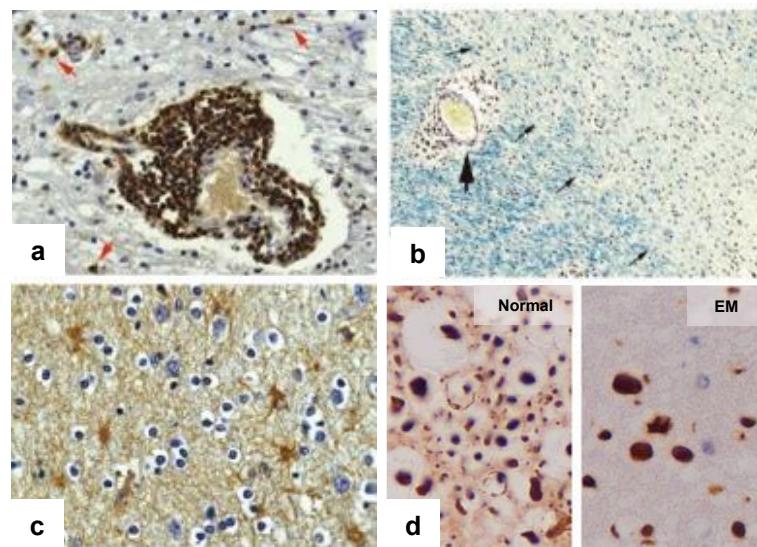


Figura 4. Histopatología de la lesión de EM. Las características histopatológicas principales de la lesión de EM son la infiltración de células inflamatorias, principalmente linfocitos y monocitos (a), la desmielinización en grado variable (b), astrogliosis (c) y pérdida de axones (d). Fotos tomadas de (Han *et al.*, 2008) (a,b,c) y de “Multiple Sclerosis: Axonal Loss Linked to MS Disability” 2010 (d)

1.3.1. Inflamación

En base a la inflamación, las lesiones de EM se han clasificado en lesiones agudas, crónicas activas y crónicas inactivas (Figura 5).

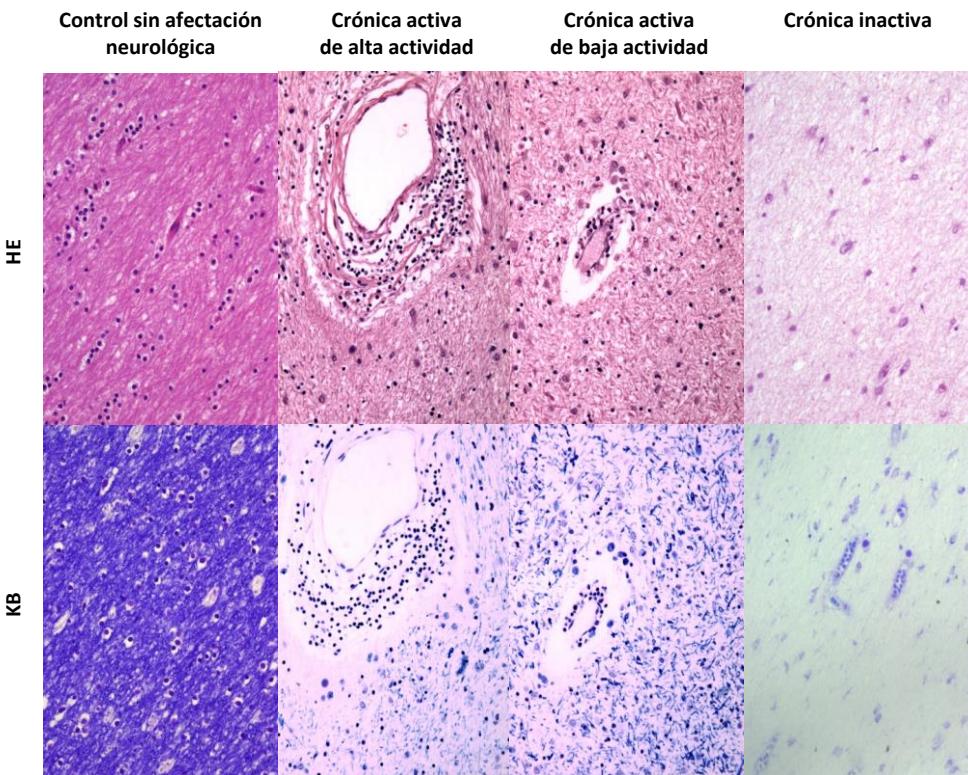


Figura 5. Tipos de lesiones crónicas en pacientes con EM que se diferencian por la actividad del proceso inflamatorio. La tinción con hematoxilina–eosina (HE) muestra el grado de infiltración celular, permitiendo observar las diferencias entre un control sin afectación neurológica y los diferentes tipos de lesiones de EM. En las lesiones crónicas activas se observan manguitos inflamatorios perivasculares. Las lesiones crónicas inactivas se caracterizan por la baja o nula actividad inflamatoria. De igual modo, con la tinción de Klüver–Barrera (KB) se evidencia la desmielinización de la lesión por la pérdida del color azul–violáceo al comparar cualquier lesión con el control sin afectación neurológica.

Las placas agudas aparecen en los primeros estadios de la formación de la lesión y se caracterizan por la presencia de infiltrados inflamatorios (compuestos principalmente por linfocitos y monocitos/macrófagos), desmielinización distribuida por toda la lesión con pérdida de oligodendrocitos, gliosis reactiva y edema en el parénquima. Las lesiones crónicas se caracterizan por una baja presencia de células inflamatorias, gran pérdida de mielina y por la formación de la cicatriz glial. Los bordes de las placas crónicas diferencian la actividad inflamatoria de la lesión. Así, los bordes de las placas crónicas activas presentan

microglía activada y macrófagos, manguitos inflamatorios perivasculares, astrocitos reactivos y, en ocasiones, presencia de anticuerpos y complemento. Las placas crónicas inactivas están determinadas por la pérdida de componente inflamatorio en el borde de la lesión. En este tipo de placas se observa una pérdida completa de oligodendrocitos acompañada de una reducción de la densidad axonal (Wu and Alvarez, 2011).

Recientemente, gracias a las técnicas de imagen por resonancia magnética (RM), técnicas histopatológicas y mediante estudios de expresión génica con *microarrays* se ha descrito que en la sustancia gris de apariencia normal (SGAN) y en la SBAN existen cambios celulares y moleculares que concuerdan con procesos patogénicos de la EM como la infiltración celular, presencia de manguitos inflamatorios perivasculares y la activación de la microglía. Además, se ha asociado un aumento en la expresión de genes tanto relacionados con el estrés oxidativo y con la inflamación como genes involucrados en procesos anti-inflamatorios y de neuroprotección que podrían limitar la progresión del deterioro (Zeis *et al.*, 2008, 2009). Se piensa que la afectación de la SBAN estaría relacionada con la expansión de la inflamación que ocurre de manera local en el tejido dañado y con una reacción inflamatoria endógena de toda la sustancia blanca que facilitaría la formación de las lesiones (Kutzelnigg *et al.*, 2005).

1.3.2. Desmielinización

La característica patológica más importante de las lesiones de EM son las placas de desmielinización en la sustancia blanca del encéfalo y de la médula espinal asociadas a los procesos inflamatorios (Lumsden, 1970). Este tipo de lesiones tienen como particularidad la pérdida de componentes de la mielina de forma extendida en las regiones perivasculares y la presencia de un elevado número de linfocitos y macrófagos infiltrantes (Frohman *et al.*, 2006). La pérdida de mielina interfiere en la conducción del impulso nervioso y, por tanto, se piensa que es la responsable de la discapacidad observada en los pacientes de EM.

Lucchinetti y colaboradores hicieron una clasificación de las lesiones de EM basándose en los mecanismos patogénicos de desmielinización. Distinguieron cuatro patrones con características inmunológicas y patológicas distintas. El patrón

I se caracteriza por el predominio de células T y macrófagos alrededor de los vasos sanguíneos y vénulas. El patrón II por la infiltración de estas células con presencia de Ig y de complemento. El patrón III presenta una elevada infiltración de células T y macrófagos que no se localizan alrededor de los capilares sanguíneos y que se da en ausencia de Ig y complemento. Además se caracteriza por la pérdida selectiva de la glicoproteína asociada a mielina considerada como un marcador de estrés metabólico en oligodendrocitos favoreciendo la oligodendroglia o lo que es lo mismo, la apoptosis de los oligodendrocitos en los bordes activos de la lesión. El patrón IV también presenta infiltración de linfocitos T y macrófagos en ausencia de Ig y complemento aunque se caracteriza por la desmielinización producida por la pérdida gradual y la distrofia de los oligodendrocitos y la ausencia de remielinización (Lucchinetti *et al.*, 2000). Recientemente se ha demostrado que, a pesar de la heterogeneidad interindividual, existe homogeneidad intraindividual del tipo de patrón de desmielinización a lo largo del curso clínico de la enfermedad (Metz *et al.*, 2014). Sin embargo existe controversia por lo que respecta a la homogeneidad de las lesiones en un mismo individuo, ya que Barnett y Prineas describieron que un paciente puede presentar heterogeneidad en las lesiones y que el patrón de la lesión además puede variar a lo largo del tiempo (Barnett and Prineas, 2004).

Aunque históricamente la EM se ha considerado una enfermedad que afecta a la sustancia blanca del SNC, también se ha descrito desmielinización en la sustancia gris, preferentemente en la corteza, la médula espinal y el cerebelo. De hecho, la desmielinización cortical es una de las características exclusiva de la EM respecto a otras enfermedades neurológicas crónicas mediadas por mecanismos inflamatorios (Fischer *et al.*, 2013). Estas lesiones están asociadas con la pérdida neuronal, se correlaciona con trastornos cognitivos y son más comunes en pacientes con formas progresivas (Amato *et al.*, 2007; Kutzelnigg *et al.*, 2005). Además, pueden variar en tamaño e incidencia incrementándose a medida que la enfermedad evoluciona (Kutzelnigg *et al.*, 2005). La desmielinización en la sustancia gris está asociada con el grado de inflamación de las meninges (Maglizzi *et al.*, 2007) que reflejan la presencia de agregados linfocitarios con características de folículos de células B (Serafini *et al.*, 2004). Se piensa que existe

algún factor soluble procedente de los infiltrados inflamatorios de las meninges que difunde por la corteza e induce desmielinización, ya sea directa o indirectamente, a través de la activación de la microglía (Lassmann, 2014).

1.3.3. Daño axonal/neuronal

La pérdida axonal es la causa principal de discapacidad neurológica permanente (Bjartmar *et al.*, 2003). En la EAE se ha demostrado que la inflamación generalizada en el encéfalo y la médula espinal viene acompañada de deterioro axonal y neuronal (Aharoni *et al.*, 2011). Esta reducción en la integridad estructural del tejido se ve reflejada en la pérdida de volumen cerebral, o lo que comúnmente se denomina, nivel de atrofia (Vigevano *et al.*, 2012).

Existen evidencias de que el daño axonal se produce de forma temprana y persistente a lo largo de la progresión de la EM (Trapp *et al.*, 1998, 1999) y que una vez ocurre, la degeneración walleriana distal sucede relativamente rápido desde la zona donde el axón ha sido transectado (Kuhlmann *et al.*, 2002). Se ha descrito que en la EM hay hasta un 60% de reducción de la densidad axonal respecto a controles sanos (Ganter *et al.*, 1999; Lovas *et al.*, 2000), lo que indica que en muchas ocasiones, aunque la sustancia blanca se encuentre intacta, se podría estar infravalorando la reducción de la densidad axonal, especialmente en pacientes crónicos con una enfermedad de larga duración (Dutta and Trapp, 2007).

En la actualidad, los expertos están de acuerdo en que existe inflamación en todos los estadios de la EM y que la degeneración neuronal ocurre siempre en un contexto inflamatorio (Frischer *et al.*, 2009). Actualmente se cree que en el caso de las fases progresivas donde el componente infamatorio es mínimo, la inflamación queda compartimentada tras una BHE cerrada o reparada que impide a su vez la entrada de gadolinio, de modo que imposibilita la visualización de las lesiones activas mediante RM (Hochmeister *et al.*, 2006).

1.3.4. Astrogliosis

Clásicamente, en la EM los astrocitos se describían como las células que tenían un efecto negativo en la resolución de las lesiones al formar la cicatriz glial e impedir físicamente la regeneración neuronal ya fuera por la secreción de moléculas que

inhibían el crecimiento de las neuritas (Fawcett, 2006), o por componentes tóxicos para las neuronas y los oligodendrocitos como las ROS, la NOS, el glutamato y el ATP (Brosnan and Raine, 2012; Roitbak and Sykova, 1999). Sin embargo, también se le han atribuido funciones protectoras que impiden la neurodegeneración secundaria mediada por niveles elevados de potasio (K^+), glutamato y purinas en el espacio extracelular (Roitbak and Sykova, 1999), así como una función relevante en la proliferación y diferenciación de células precursoras neuronales mediante la expresión de factores de crecimiento y moléculas de señalización (Brosnan and Raine, 2012). En la actualidad, a los astrocitos se le atribuyen múltiples funciones en la patogenia de la EM dependiendo del estadio y topografía de la lesión. (Brosnan and Raine, 2012). Se ha descrito que los astrocitos liberan factores que pueden suprimir o favorecer las propiedades funcionales de la BHE (Alvarez *et al.*, 2011) y que tienen capacidad fagocítica y de presentación antigénica, de manera que podrían ser relevantes en la re-estimulación de las células T que se infiltran en el SNC (Keyser *et al.*, 2003). Además, complementan la respuesta inmunológica expresando citocinas que contribuyen al desarrollo o a la reparación de la lesión, como la IL-6, el TGF- β , el TNF y la IL-12 (Campbell *et al.*, 1993, 2010).

1.3.5. Reparación tisular

La remielinización es un proceso esencial para la supervivencia del axón ya que permite restaurar la conducción saltatoria del impulso nervioso en el SNC. La presencia de OPC en el SNC adulto es indicativo de la capacidad de reparación intrínseca del mismo. Se ha demostrado que la remielinización puede darse en pacientes con EM independientemente de la fase de la enfermedad en la que se encuentren. Sin embargo, la localización de la lesión puede favorecer la reparación, siendo las zonas corticales y subcorticales de la sustancia blanca las áreas que frecuentemente remielinizan (Patrikios *et al.*, 2006).

Para que haya remielinización es necesaria la presencia de axones desmielinizados y el reclutamiento de las OPC hacia las áreas lesionadas así como la consiguiente proliferación y diferenciación a oligodendrocitos maduros productores de mielina. El fallo en la remielinización puede deberse a un defecto en cualquiera de estos eventos por separado. En base a esto, se ha observado que algunas lesiones no

remielinizan por la pérdida de axones, por la falta de un número suficiente de OPC (fallo en la migración y el reclutamiento), porque los precursores no pueden diferenciarse a oligodendrocitos maduros o porque la mielina producida es más inestable y hace que la lesión sea más vulnerable (Lassmann, 2014; Williams *et al.*, 2007). Los factores principales que impiden que la remielinización sea eficiente en los pacientes con EM son la pérdida del reservorio natural de OPC, especialmente durante la fase progresiva de la enfermedad, y la presencia de factores inhibidores de la diferenciación oligodendroglial. Entre ellos se encuentran componentes derivados de la mielina (Plemel *et al.*, 2013), componentes de la matriz extracelular, como el ácido hialurónico (Back *et al.*, 2005), moléculas inhibitorias que interaccionan con vías de señalización involucradas en la oligodendrogénesis durante el desarrollo, como las vías de Notch (John *et al.*, 2002) y Wnt (Fancy *et al.*, 2009), o proteínas como LINGO-1, que interaccionan con el receptor de Nogo e inducen mecanismos inhibitorios de la remielinización (Mi *et al.*, 2013).

Actualmente se están estudiando qué factores de crecimiento favorecen los procesos de remielinización. Se ha descrito que el factor de crecimiento derivado de plaquetas y el factor de crecimiento de fibroblasto-2 son necesarios para la proliferación de las OPC en áreas desmielinizadas (Frost *et al.*, 2003) y que otros factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina (NT)-3, la NT-4, la NT-5 y factores neurotróficos producidos por las células gliales reducen la muerte neuronal y favorecen el crecimiento axonal, la remielinización y la regeneración (Kalb, 2005).

1.4. Tratamientos

El componente inflamatorio de la enfermedad ha sido ampliamente estudiado y en consecuencia, la mayoría de los tratamientos disponibles en la actualidad tienen como objetivo principal modular la respuesta inmune en los pacientes con formas en brotes (Cree, 2014); (Loleit *et al.*, 2014).

La administración de dosis altas de corticoides como la metilprednisolona se utiliza como primera opción terapéutica en el tratamiento del brote. En casos graves con importante compromiso funcional, cuando no responden adecuadamente al

tratamiento con corticoides, se puede eliminar los auto-anticuerpos de la circulación mediante plasmaféresis (Meca-Lallana *et al.*, 2003; Weinshenker *et al.*, 1999).

En los años 90, el IFN- β y el acetato de glatirámero (GA) surgieron como las primeras terapias inmunomoduladoras y se establecieron como tratamientos de primera línea en los pacientes con EMRR. El tratamiento con IFN- β está basado en su capacidad para inhibir el IFN- γ producido por las células T reactivas pro-inflamatorias (Revel *et al.*, 1995). Se ha descrito que el tratamiento con IFN- β tiene múltiples efectos inmunomoduladores en las células T y estabiliza la BHE (Markowitz, 2007). El GA es un péptido sintético que ejerce efectos inmunomoduladores a través de varios mecanismos (Aharoni, 2013) entre ellos, interfiriendo en el reconocimiento específico de antígeno al unirse al MHC-II (Fridkis-Hareli *et al.*, 1994), induciendo la diferenciación de células Th2 y Th3 productoras de citocinas anti-inflamatorias (Hestvik *et al.*, 2008) y disminuyendo el número de células Th17 favoreciendo el de las células Treg (Aharoni *et al.*, 2010). Debido a su adecuado perfil de seguridad y eficacia en la reducción de brotes y en la disminución de la gravedad de la enfermedad, ambos tratamientos se usan como tratamientos de primera línea. En Europa también se ha aprobado el uso del IFN- β 1b para las formas EMSP con brotes en las que se ha visto una reducción de la tasa de brotes (Kappos *et al.*, 2001)..

En el caso de pacientes que no responden bien a estos fármacos o que presentan una enfermedad más agresiva se opta por una terapia de segunda línea basada en la inmunosupresión. Entre ellos, se encuentra el Natalizumab y el recién aprobado Fingolimod.

El Natalizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une al VLA-4 de linfocitos impidiendo su extravasación al SNC (Stüve *et al.* 2006) . Aunque tiene una elevada eficacia (Polman *et al.*, 2006), puede ocasionar efectos adversos graves como el desarrollo de leuкоencefalopatía multifocal progresiva (LMP) (Kleinschmidt-DeMasters *et al.*, 2012), incrementándose el riesgo si el tratamiento se prolonga en más de dos años, si el paciente ha sido previamente tratado con inmunosupresores, o si presenta anticuerpos frente al virus JC (Gorelik *et al.*, 2010).

Además, la retirada del tratamiento también puede originar el desarrollo de un síndrome inflamatorio de reconstitución inmune (Kleinschmidt–DeMasters *et al.*, 2012; Vidal–Jordana *et al.*, 2014).

El Fingolimod ha sido el primer tratamiento oral aprobado para la EM. Se trata de un análogo estructural del lípido de membrana esfingosina–1 fosfato que impide la salida de los linfocitos de los ganglios linfáticos hacia los vasos sanguíneos (Scott, 2011). Es un fármaco que reduce la frecuencia de los brotes y la progresión de la discapacidad y que puede ocasionar arritmias durante la primera dosis como efecto secundario grave por lo que requiere su monitorización durante la primera administración (Cree, 2014).

Otro compuesto aprobado recientemente en USA y Europa es la teriflunomida que inhibe una enzima mitocondrial y disminuye la síntesis de ADN en células T, B y otras células de rápida división celular. A pesar de tratarse de un fármaco seguro y bien tolerado, está contraindicado en mujeres gestantes debido a sus potenciales efectos teratogénicos (Perumal and Khan, 2012).

Otras terapias emergentes que están en sus últimas etapas de desarrollo son el dimetil fumarato, aprobado en USA y Europa, que aparentemente aumenta los niveles de antioxidantes, protege a las neuronas del estrés oxidativo y posee efectos anti–inflamatorios; y el laquinimod, capaz de reducir el número de infiltrados inflamatorios e inducir la polarización a Th2. También está aprobado en Europa el anticuerpo monoclonal Alemtuzumab (anti–CD52). Daclizumab (anti–CD25), Ocrelizumab y Ofatumumab (anti–CD20) (Loleit *et al.*, 2014; Perumal and Khan, 2012) están en fase de ensayo clínico.

Se están haciendo muchos esfuerzos en desarrollar terapias dirigidas al componente neurodegenerativo del SNC de la EM. Los péptidos derivados de la mielina así como las moléculas inhibitorias de la diferenciación oligodendrogial (Jagged–1, Tcf4 o moléculas antagonistas de Lingo–1) se están estudiando como dianas terapéuticas potenciales que favorecerían la remielinización en el SNC (Kremer *et al.*, 2011). Ya que la desmielinización altera la demanda energética y la homeostasis iónica intracelular, también se está estudiando el bloqueo de canales de Na^+ , Ca^{2+} y K^+ (Cree, 2014).

El desafío actual en la EM es obtener un fármaco que combine un efecto inmunomodulador a la vez que favorezca la neuroprotección e induzca la reparación del SNC. Por este motivo, los tratamientos actuales inmunomoduladores o inmunosupresores, están bajo estudio para averiguar si también poseen propiedades neorregenerativas. En esta línea, se ha descrito que el IFN- β reduce el daño axonal, estimula la producción del factor de crecimiento nervioso e inhibe la activación de la microglía, la astrogliosis y la producción de factores neurotóxicos (Kieseier and Hartung, 2007). En el caso del GA se ha demostrado que incrementa los niveles de BDNF, que aumenta la proliferación y diferenciación de las OPC y que favorece la neurogénesis (Aharoni *et al.*, 2005). Por último, la capacidad que tiene el Fingolimod para atravesar la BHE hace que pueda facilitar la reparación neural y la remielinización a la vez que disminuir la astrogliosis, aunque continua habiendo controversia sobre su efecto en los oligodendrocitos (Miron *et al.*, 2010).

2. *Encefalomieltitis autoinmune experimental*

La EAE es una enfermedad experimental inducida que desencadena la inflamación y desmielinización del SNC, de modo que comparte parcialmente características clínicas, patogénicas e histopatológicas con la EM. Como tal, la EAE es una enfermedad heterogénea influenciada por componentes genéticos, ambientales y por el protocolo de inducción (antígeno, adyuvantes, etc.) (Simmons *et al.*, 2013). Los primeros modelos de EAE se desarrollaron utilizando un homogeneizado del SNC. Posteriormente, se purificaron algunas de las proteínas que formaban parte del homogeneizado, proteínas mielínicas, y se desarrollaron diferentes modelos utilizando principalmente la MBP, la proteína proteolipídica (PLP) y la MOG (Gardinier *et al.*, 1992). Actualmente se utilizan tanto estas proteínas como péptidos encefalitogénicos derivados de ellas. Estos péptidos han facilitado la reproducibilidad de los modelos de EAE y se ha conseguido inducir la enfermedad en cepas que eran resistentes a las proteínas completas.

Los modelos de EAE han permitido estudiar los mecanismos patogénicos relacionados con la respuesta inflamatoria mediada por células T. Gracias a la generación de ratones transgénicos y *knockout* se ha podido estudiar la función de múltiples moléculas que están implicadas en la patogenia de la EM, contribuyendo

al desarrollo de nuevos fármacos que están en la práctica clínica actual (Gold *et al.*, 2006).

2.1. Inducción de la EAE

La EAE puede inducirse de forma activa o bien por transferencia pasiva. En la inmunización activa se utilizan proteínas de la mielina o péptidos derivados de ellas junto con el adyuvante completo de Freund. La mayoría de modelos de EAE requieren la administración de un toxina bacteriana (toxina *pertussis*), que aunque se desconoce su función específica, parece que interviene en la permeabilización de la BHE permitiendo la entrada de las células inflamatorias al SNC (Bruckener *et al.*, 2003). En la inmunización pasiva se transfieren células T CD4+ antígeno específicas activadas procedentes de animales con EAE (Stromnes and Goverman, 2006), lo que demuestra la naturaleza autoinmune de la enfermedad.

2.2. Curso clínico de la EAE

Transcurridos unos 10 días de la inmunización activa o 3–4 días de la transferencia pasiva, aparecen los primeros signos clínicos de la EAE. Estos consisten en una parálisis ascendente que se inicia con flacidez y pérdida de tono muscular dando lugar a la aparición de paresias que comienza en la cola y se extiende causando paraparesia o paraplejia de los miembros posteriores, pudiendo alcanzar la tetraparesia o tetraplejia del animal y ocasionalmente la muerte (Moreno *et al.*, 2012; Pachner, 2011). La aparición de los signos clínicos suele ir precedida de un descenso importante (10–30%) del peso corporal que se prolonga hasta la estabilización o remisión de la enfermedad (Moreno *et al.*, 2012).

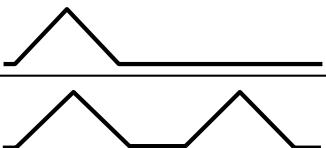
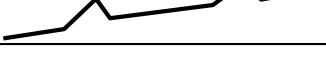
Según la cepa y el antígeno utilizado en la inmunización, el curso clínico puede variar y reproducir diferentes características patogénicas y/o histopatológicas así como diferentes formas clínicas de la EM. Como ejemplo, las ratas Lewis inmunizadas con la MBP o con péptidos derivados de esta proteína presentan un único brote clínico de la enfermedad (EAE aguda) (Lenz *et al.*, 1999; Stepaniak *et al.*, 1997); los ratones de la cepa SJL inmunizados con la PLP o péptidos derivados de ella cursan una enfermedad con brotes clínicos (Polman *et al.*, 1988) o los ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con la proteína MOG o péptidos derivados de ella desarrollan un curso clínico progresivo y que se estabiliza con una fase

crónica (Acha-Orbea *et al.*, 1988; Mendel *et al.*, 1995; Weissert *et al.*, 1998) (Tabla 1).

2.3. Histopatología

A diferencia de la EM, los modelos clásicos de EAE se caracterizan por presentar lesiones principalmente en la médula espinal, mientras que son más escasas en el encéfalo. Se observan infiltrados inflamatorios perivasculares formados principalmente por células T y macrófagos. En las lesiones de la mayoría de los modelos de EAE predominan las células T CD4+ asociadas con una inflamación global y relativamente poca desmielinización, en contraste con la EM donde las células T CD8+ son predominantes (Babbe *et al.*, 2000; Friese and Fugger, 2009). Los modelos de EAE han ido evolucionando y actualmente existen modelos que reproducen diferentes características patológicas de la EM tales como la presencia de lesiones inflamatorias desmielinizantes focales con un grado variable de remielinización en encéfalo y médula espinal (Storch *et al.*, 1998), el daño axonal y la pérdida neuronal en la lesión (Kornek *et al.*, 2000), además de la desmielinización cortical (Pomeroy *et al.*, 2005; Storch *et al.*, 1998).

Tabla 1. Clasificación de algunos de los modelos de EAE según el curso clínico.

Antígeno	Especie/cepa	Curso Clínico	
MBP	Rata Lewis	Agudo	
	PL/J		
	B10.PL		
PLP ₁₃₉₋₁₅₁	Ratón SJL/J	Recurrente remitente	
MOG ₁₋₁₂₅	Rata DA		
SCH	Ratón Biozzi	Secundaria progresiva	
MOG ₃₅₋₅₅	NOD		
MOG	Rata DA	Primaria progresiva	
MOG ₃₅₋₅₅	Ratón C57BL/6	Progresiva crónica	
PLP ₁₇₈₋₁₉₁			
MP4			
MOG	Rata Lewis		

SCH: homogeneizado de médula espinal; MP4: proteína de fusión MBP-PLP; NOD: *Non obese diabetic mice*; DA: *Dark agoutí*.

3. **Semaforinas**

Las semaforinas son proteínas que se describieron en los años 90 como moléculas de guía axonal quimiorrepulsivas o quimioatrayentes en el SNC (Kolodkin *et al.*, 1992). Su función durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso ha sido ampliamente estudiado, sin embargo las semaforinas también se expresan en el desarrollo temprano participando en el desarrollo del sistema nervioso central adulto completo y funcional (Pasterkamp and Giger, 2009). Las semaforinas también están presentes en otros tejidos adultos y tienen un papel importante en distintos procesos fisiológicos y patológicos, entre los que se incluye la respuesta inmune, la organogénesis y la vascularización (revisado en (Roth *et al.*, 2009)). Además se ha descrito que pueden ejercer un papel importante en ciertos tipos de cáncer actuando como supresores o promotores tumorales (Rehman and Tamagnone, 2012). Las semaforinas involucradas en la respuesta inmune se han denominado inmunosemaforinas o semaforinas inmunes. Éstas, por su doble función, en el SNC y en el sistema inmune, resultan muy atractivas en el contexto de la EM.

Hasta la fecha se han descrito 20 semaforinas distintas (Kolodkin *et al.*, 1992) que se clasifican en ocho clases. Las clases 1 y 2 se expresan solo en invertebrados, las clases, 3, 4, 6 y 7 se encuentran exclusivamente en vertebrados, las de clase 5 se expresan en ambos y las de clase V son semaforinas virales ('Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. Semaphorin Nomenclature Committee', 1999). Todas las semaforinas tienen un dominio amino terminal extracelular de aproximadamente 500 aminoácidos denominado dominio sema. Dependiendo de la subclase, las semaforinas contienen motivos específicos adicionales en la posición carboxi-terminal, incluyendo dominios tipo inmunoglobulinas y dominios trombospondina de tipo 1. Además, las semaforinas difieren unas de otras respecto al anclaje de membrana pudiendo ser de unión transmembranal de tipo 1 (semaforinas de clase 1, 4, 5, y 6), de anclaje glicofosfatidilinositol (GPI) (semaforina (sema)7A) o secretadas (semaforinas de clase 2 y 3).

3.1. Receptores de las semaforinas

Las plexinas (PLXN) se han identificado como los receptores principales de las semaforinas. Están divididas en 4 grupos (A–D) y median la señalización celular (Tamagnone *et al.*, 1999). La mayoría de semaforinas se unen directamente a plexinas mientras que las de clase 3 necesitan la unión a neuropilinas (Np) como co-receptor (Takahashi *et al.*, 1999), excepto la sema3E que no necesita unirse a Np para ejercer sus funciones. Se han descrito otros receptores a los que pueden unirse las semaforinas, como los proteoglicanos, moléculas de adhesión celular, los dominios de Ig de células T, los dominios de mucina tipo 2, CD72, Ron, Met, Off-track y el receptor de factor de crecimiento vascular endotelial (Suzuki *et al.*, 2008; Takamatsu and Kumanogoh, 2012). La diversidad funcional que ejercen las semaforinas en los diferentes tejidos puede deberse a la variedad de receptores a los que pueden unirse.

3.2. Semaforinas inmunes

El sistema nervioso y el sistema inmune comparten una red de interacciones altamente organizada y compleja entre células y moléculas mediadoras (Procaccini *et al.*, 2014; Steinman, 2004). Como ya se ha mencionado, muchas semaforinas también tienen función directa en la regulación de la respuesta inmune (Figura 6), ya sea interviniendo en el contacto y/o la migración celular (sema3A, sema3E y sema7A) como en la formación de la sinapsis inmunológica entre células T y las APC (sema4D, sema4A, sema6D y sema7A) (Okuno *et al.*, 2011). Por su doble funcionalidad tanto en el SNC como en el sistema inmune, las inmunosemaforinas son dianas terapéuticas potenciales, y muy atractivas, para el tratamiento de la EM (Eixarch, Gutiérrez-Franco, *et al.*, 2013; Kumanogoh *et al.*, 2005; Okuno *et al.*, 2011).

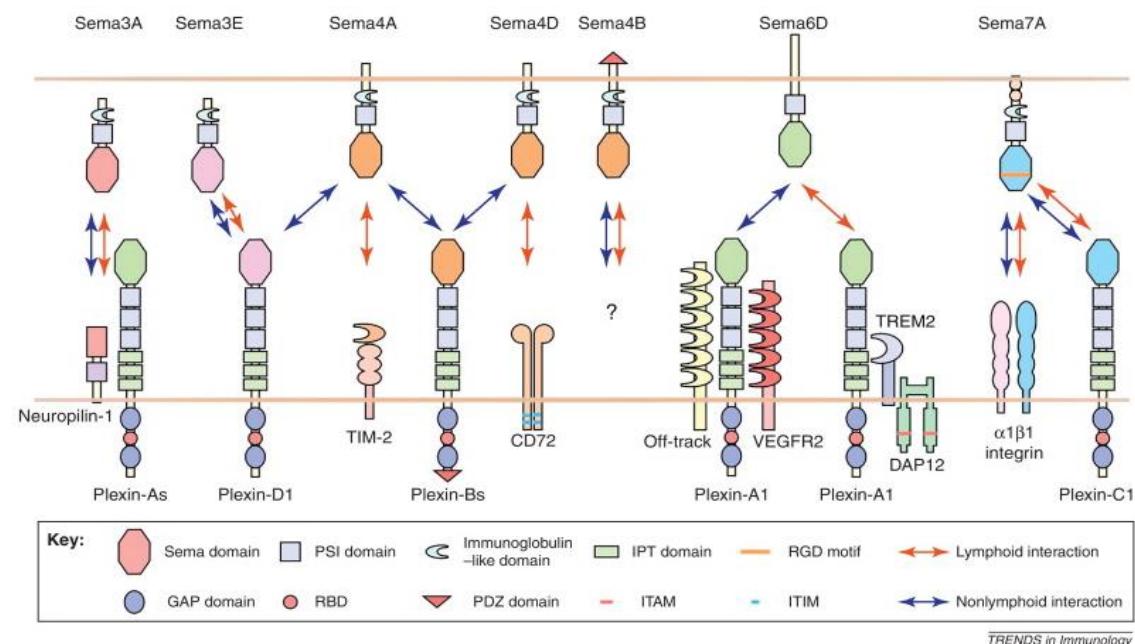


Figura 6. Clasificación de las semaforinas inmunes, sus receptores y sus vías de actuación. Imagen tomada de (Takamatsu and Kumanogoh, 2012).

3.2.1. Sema3A

La sema3A fue la primera semaforina identificada en vertebrados (Luo *et al.*, 1993) cuya función durante el desarrollo el SNC está relacionada con la repulsión de axones. Es la única semaforina inmune secretada y lo hace como un homodímero de 95 kDa que puede ser proteolizada a una forma monomérica de 65 kDa que posee una actividad menor (Adams *et al.*, 1997; Klostermann *et al.*, 1998).

La sema3A se expresa en una gran variedad de células inmunes maduras y diferenciadas en el adulto, estando presente en diversos procesos biológicos. La interacción entre la sema3A y sus receptores inhibe la proliferación de las células T mediada por las DC (Lepelletier *et al.*, 2006). También se ha descrito su función como inductor de la apoptosis en células leucémicas (Moretti *et al.*, 2008) y en los macrófagos diferenciados por el factor de estimulación de colonias de macrófagos (M-CSF) (Ji *et al.*, 2009). Otra de las funciones más importantes de la sema3A en las células inmunes es la regulación de la migración de los timocitos (Lepelletier *et al.*, 2007), los monocitos (Delaire *et al.*, 2001) y de las DC (Takamatsu *et al.*, 2010). La migración hacia los ganglios linfáticos de las DC que expresan el complejo receptor PLXN-A1/Np-1, está mediada por la interacción con la sema3A secretada por las células endoteliales linfáticas (Takamatsu *et al.*, 2010). Estos hallazgos podrían indicar que el defecto en la activación de las células T observado

en ratones deficientes en PLXN-A1 se debería principalmente a la incapacidad de que las DC migren adecuadamente hacia los ganglios linfáticos.

Algunos estudios han demostrado el potencial inmunomodulador de la sema3A en varios contextos. La sema3A secretada por las células tumorales podría actuar de forma paracrina impidiendo la activación de las células T presentes en el microambiente tumoral e inhibiendo su capacidad de producir citocinas (Catalano *et al.*, 2006). Las células T activadas y las DC activadas por citocinas inflamatorias expresan homodímeros de sema3A. Sin embargo, la maduración *in vitro* de las DC mediante la vía de señalización CD40/CD40L resulta en la producción de la isoforma monomérica de 65 kDa de la sema3A, la cual podría actuar como antagonista de la forma activa de 95 kDa (Lepelletier *et al.*, 2006). Por otro lado, el receptor funcional de la sema3A en las células inmunes, la Np-1, (Catalano *et al.*, 2006; Lepelletier *et al.*, 2006), se expresa tanto en las células T vírgenes como en las DC y participa en la formación de la sinapsis inmune vía interacciones homotípicas, resultando relevante en el inicio de la respuesta inmune (Tordjman *et al.*, 2002). La sema3A no interfiere en la formación de las sinapsis inmunes, sino que modula la respuesta de las células T bloqueando la reorganización de la actina del citoesqueleto. Este bloqueo impide la redistribución de los receptores de las células T (TCR) en la zona de contacto entre las DC y los linfocitos T e inhibe la señal de activación mediada por el TCR (Lepelletier *et al.*, 2006), probablemente a través de la vía de señalización mediada por PLXN-A4 (Yamamoto *et al.*, 2008). Sin embargo, la secreción de la sema3A por células T activadas durante la respuesta inmune es tardía, lo que sugiere que la interacción entre la sema3A y la Np-1 participaría en la terminación de la respuesta inmune limitando la sobreactivación de los linfocitos T. De hecho, la expresión de la sema3A también se ha observado en las células madre mesenquimales, lo que explicaría la capacidad inmunosupresora ya conocida de estas células (Lepelletier *et al.*, 2010). Independientemente de la función supresora que ejerce la sema3A en la respuesta inmune adaptativa, se ha descrito que la producción de la sema3A inducida por la presencia de LPS favorece la secreción de citocinas pro-inflamatorias en macrófagos a través de la interacción con la PLXN-A4 durante la respuesta inmune innata (Wen *et al.*, 2010).

3.2.2. Sema7A

La sema7A es una proteína anclada a la membrana citoplasmática por un dominio GPI que tiene un alto grado de homología con la semaforina vírica que expresa el virus de la viruela y el virus herpes (Comeau *et al.*, 1998; Lange *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998). La sema7A también puede existir como proteína soluble (Kopp *et al.*, 2010; Ohsawa *et al.*, 2009; Pasterkamp *et al.*, 2003). En el sistema inmune, la sema7A se expresa preferentemente en los linfocitos T y B activados, en las células NK (Angelisova *et al.*, 1999) y en los monocitos (Holmes *et al.*, 2002). Además, en el sistema hematopoyético, la expresión de la sema7A en eritrocitos define el antígeno del grupo sanguíneo humano John Milton Hagen (JMH) (Bobolis *et al.*, 1992) que se ha asociado a un desorden autoinmune benigno, lo que sugiere una posible implicación de esta proteína en la patogenia de las enfermedades autoinmunes. Aunque se ha demostrado que la sema7A se une a la PLXN-C1 (Comeau *et al.*, 1998; Tamagnone *et al.*, 1999), el efecto de esta semaforina en el sistema inmune está mediado por su unión con la $\alpha 1\beta 1$ -integrina (Suzuki *et al.*, 2007). La sema7A ejerce un papel esencial en la fase efectora de la respuesta inmune mediada por células T y actúa como señal quimioatravente para los monocitos/macrófagos según se ha descrito en estudios *in vitro* (Holmes *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2007). La sema7A también funciona como molécula efectora induciendo la producción de citocinas pro-inflamatorias y la liberación de iones superóxido por parte de los monocitos/macrófagos y, en menor medida, de los neutrófilos (Holmes *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2007). La sema7A que se expresa en las células T CD4+ activadas se acumula en la zona de contacto entre los linfocitos T y las APC e induce la redistribución y agrupación en la membrana de la $\alpha 1\beta 1$ -integrina, favoreciendo la formación del complejo de adhesión entre ambas células (Holmes *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2007). Todos estos hallazgos indican que la sema7A es una molécula importante en la sinapsis inmune.

3.3. Semaforinas en el sistema nervioso adulto

Las semaforinas en el sistema nervioso adulto siguen teniendo funciones repulsivas o atrayentes como moléculas de guía axonal, estabilizando las redes neuronales y limitando el crecimiento axonal en el SNC lesionado contribuyendo, de este modo, al fallo en la regeneración (Giger *et al.*, 2010). Además, la expresión de las

semaforinas en el SNC adulto se ha relacionado con la plasticidad neuronal, en el control de la formación de las sinapsis y espinas dendríticas, en la excitabilidad neuronal en el hipocampo y también se ha asociado a diferentes enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas (Pasterkamp and Giger, 2009).

3.3.1. Sema3A

En el sistema nervioso adulto, la sema3A se expresa en las neuronas tanto en el sistema nervioso periférico (SNP) como en el SNC. Tras sufrir una lesión, el SNP y el SNC se comportan de formas distintas a nivel de regeneración axonal, ya que solo los nervios periféricos se regeneran completamente, mientras que los axones del SNC se deterioran (Brosius Lutz and Barres, 2014). En el caso del SNC, el establecimiento de un ambiente no permisivo impide la regeneración neuronal. En modelos de daño medular por sección, el nivel de expresión de la sema3A en las neuronas disminuye inmediatamente después del daño axonal coincidiendo con la pérdida de motoneuronas y va aumentando de forma gradual inhibiendo la regeneración axonal (Hashimoto *et al.*, 2004). Además, la combinación de la secreción de la sema3A por la cicatriz glial y la expresión de su complejo receptor en las neuronas lesionadas hace que la capacidad regenerativa de los axones quede inhibida (Kaneko *et al.*, 2006; De Winter *et al.*, 2002). También, se ha observado que bloqueando la actividad de la sema3A se favorece la regeneración de los axones (Montolio *et al.*, 2009). Todos estos hallazgos apoyan la idea de que la sema3A tiene una función inhibidora en la regeneración del SNC adulto.

A la sema3A se le han atribuido otras funciones distintas a las de guía axonal. En ciertos contextos, el papel de la sema3A está relacionado con la expresión de la sema3F. La sema3A limita la migración de las OPC hacia las áreas lesionadas en el SNC adulto, al contrario que la sema3F, que la promueve (Piaton *et al.*, 2011). En condiciones inflamatorias, donde ocurre estrés neuronal, la sema3A actúa como agente neuroprotector induciendo la apoptosis de la microglía mediante la interacción con Np-1/PLXN-A1 (Majed *et al.*, 2006), esta función pro-apoptótica de la sema3A también se ha podido observar *in vitro* en macrófagos derivados de monocitos humanos (Ji *et al.*, 2009). Además, hay datos que indican que la sema3A podría estar involucrada en el desarrollo de algunas enfermedades

neurológicas como la epilepsia (Holtmaat *et al.*, 2003), el Alzheimer (Good *et al.*, 2004) y la esquizofrenia (Eastwood *et al.*, 2003).

3.3.2. Sema7A

Durante el desarrollo, la sema7A actúa principalmente como agente quimioatrayente del cono de crecimiento axonal. En el adulto, esta proteína se expresa en diferentes tejidos, como el sistema nervioso, tejidos linfoides, los testículos y los pulmones (Mine *et al.*, 2000; Yamada *et al.*, 1999). En el SNC, la sema7A se une a las $\beta 1$ -integrinas y señaliza a través de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (Pasterkamp *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2007). Aunque la interacción entre la PLXN-C1 y la sema7A parece estar involucrada en la formación de la red neuronal durante el desarrollo embrionario, el patrón de expresión diferencial de ambas proteínas en el SNC adulto sugiere que podrían tener funciones independientes (Pasterkamp *et al.*, 2007). La sema7A se expresa en células neuronales y gliales tanto en el SNC sano como en el SNC dañado (Kopp *et al.*, 2010; Pasterkamp *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 1998) y está involucrada en la maduración de la formación de la cicatriz glial tras un daño en la médula espinal. La sema7A se expresa en neuronas dañadas inmediatamente después de que se haya inducido una lesión y aumenta su expresión en los astrocitos que rodean la cicatriz glial. Este perfil de expresión temporal transcurre de manera paralela a la formación de la cicatriz glial (Kopp *et al.*, 2010). Los pocos resultados publicados hasta el momento sobre la sema7A, ponen de manifiesto la necesidad de estudiar en mayor profundidad su función en el sistema nervioso adulto.

3.4. Semaforinas en la EM

Como ya se ha mencionado, algunas de las semaforinas tienen una función muy relevante en la regulación de la respuesta inmune. Entre ellas, la sema3A, la sema4A, la sema4D, la sema7A y sus receptores han sido estudiados en el contexto de la EAE sugiriendo que podrían ser dianas terapéuticas en la EM.

Tabla 2. Funciones de la sema3A y la sema7A en el SNC y el sistema inmune.

	Sistema inmune	SNC
Sema3A	<ul style="list-style-type: none"> • Aumenta la migración de DC hacia los ganglios linfáticos (Catalano <i>et al.</i>, 2006). • Induce la apoptosis en macrófagos diferenciados por el M-CSF (Ji <i>et al.</i>, 2009). • Limita la activación de la respuesta inmune (Lepelletier <i>et al.</i>, 2010). 	<ul style="list-style-type: none"> • Impide la entrada de axones en regeneración en la cicatriz glial (Kaneko <i>et al.</i>, 2006; De Winter <i>et al.</i>, 2002). • Inhibe la migración de OPC hacia áreas lesionadas (Piaton <i>et al.</i>, 2011). • Induce apoptosis de la microglía debido al estrés neuronal en un contexto inflamatorio (Majed <i>et al.</i>, 2006).
Sema7A	<ul style="list-style-type: none"> • Señal quimioatravente para monocitos/macrófagos (Holmes <i>et al.</i>, 2002; Suzuki <i>et al.</i>, 2007). • Induce la producción y secreción de citocinas pro-inflamatorias por los monocitos/macrófagos (Holmes <i>et al.</i>, 2002; Suzuki <i>et al.</i>, 2007) • Define el grupo sanguíneo John Milton Hagen (Bobolis <i>et al.</i>, 1992). 	<ul style="list-style-type: none"> • Maduración de la cicatriz glial (Kopp <i>et al.</i>, 2010).

Se ha descrito que el bloqueo de la sema4A mediante anticuerpos, en ratones con EAE, disminuye el número de células inflamatorias mononucleares infiltradas en el SNC y reduce la respuesta específica de las células T CD4+ frente al antígeno encefalitogénico (Kumanogoh, Marukawa, *et al.*, 2002). En el caso de la sema4D, se ha observado que en ausencia de dicha proteína o de su receptor, la PLXN-B1, el curso clínico de la EAE en ratones mejora, observándose un fallo en la diferenciación/activación de las células T productoras de citocinas, sugiriendo su implicación en la activación de las células T a través del contacto con las DC (Kumanogoh, Suzuki, *et al.*, 2002). Además, la administración de anticuerpos anti-sema4D en animales con EAE, también redujo la neuroinflamación (Okuno *et al.*, 2010). Por otro lado, la PLXN-A1 ha resultado ser indispensable en la activación de las células T CD4+ específicas de antígeno al observar que ratones deficientes en esta proteína no desarrollaban la EAE (Takegahara *et al.*, 2006). Aunque la PLXN-A1 forma parte del receptor de las semaforinas de clase 3, se ha demostrado que los efectos asociados a la ausencia de PLXN-A1 en la respuesta inmune no se deben a la presencia de la sema3A, sino a la de la sema6D (Takegahara *et al.*, 2006), sugiriendo esta vía de señalización relevante en el tratamiento de la EM.

3.4.1. Sema3A

La sema3A podría ser una diana terapéutica prometedora para el tratamiento de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (AR) o el lupus eritematoso sistémico (LES). Las células T CD4+ procedentes de pacientes con AR no expresan la sema3A, mientras que se ha observado que al sobre-expresar esta proteína en el modelo animal de AR se consigue prevenir la enfermedad y retrasar su progresión (Catalano, 2010). En la misma línea, se ha descrito una reducción de la expresión de la sema3A en el tejido sinovial de pacientes con AR lo que podría contribuir a la patogenia de la enfermedad (Takagawa *et al.*, 2013). También se ha publicado recientemente que los niveles de la sema3A en el suero de pacientes con LES están disminuidos y que además se ha encontrado una asociación inversa con la actividad de la enfermedad. De este modo la sema3A podría ser un buen candidato como marcador de la actividad de esta enfermedad. En los pacientes con LES, tanto la expresión de la sema3A como la de su receptor, la Np-1, se encuentran

disminuidas en las células Breg respecto a pacientes con AR y controles sanos. (Vadasz *et al.*, 2012).

Sin embargo, en la EM están involucrados tanto el sistema inmune como el sistema nervioso. En este contexto, la sema3A podría tener una función beneficiosa ya que participa en la finalización de la respuesta inmune mientras que, por el contrario, a nivel del SNC la sema3A estaría dificultando o impidiendo la regeneración tisular mediante la inhibición de la migración de las OPC hacia la zona lesionada o bien por su actividad repulsiva que impediría la ramificación de las neuronas dañadas. En la EAE, se ha descrito la posible función de la PLXN-A1 y la PLXN-A4 en la patogenia de la enfermedad. Se ha observado que los ratones deficientes en PLXN-A1 son resistentes al desarrollo de la EAE debido probablemente a un defecto en la activación de células T mediado por el fallo en la migración de las DC (Takamatsu *et al.*, 2010). Sin embargo, los ratones deficientes en PLXN-A4 muestran un empeoramiento del curso clínico al presentar hiperactivación de las células T específicas para la MOG (Yamamoto *et al.*, 2008). Los autores del estudio proponen que la vía de señalización sema3A/Np-1/PLXN-A4 estaría implicada en la patogenia de la EAE. Estos hallazgos están en concordancia con otro estudio que demuestra que los animales que reciben células T CD4+ que sobre-expresan la Np-1 y que son específicas frente a MOG son mucho más resistentes a desarrollar la EAE. Además, se ha observado que el curso clínico de la EAE era más grave en ratones que carecían de Np-1 en las células T CD4+ respecto a los ratones control. Por todo ello, uno de los mecanismos que los autores proponen es la implicación de la vía de señalización de sema3A/Np-1/PLXN-As en la limitación de las interacciones entre células T y las APC durante la respuesta inmune (Solomon *et al.*, 2011).

La sema3A podría también participar en los procesos de reparación de la mielina en la EM. Los transcritos de la sema3A y la sema3F están aumentados en las neuronas de la sustancia gris, en los astrocitos y en las células de la microglía que rodean o residen en las lesiones activas inflamatorias tanto en pacientes con EM como en un modelo experimental de desmielinización inducido por lisolecitina (Williams *et al.*, 2007). Piaton y colaboradores definieron el papel funcional de la sema3A en la remielinización en el SNC adulto y mostraron que la sema3A y la

sema3F tienen funciones opuestas en la regulación del reclutamiento de las OPC hacia las áreas desmielinizadas en el SNC en un modelo experimental de desmielinización inducido por lisolecitina (Piaton *et al.*, 2011). Los niveles de expresión de la sema3F y de su receptor, la Np-2, aumentaron tras la desmielinización, induciendo el reclutamiento de las OPC hacia la lesión. De igual manera, la sobre-expresión de la sema3F se correlacionó con un aumento en la remielinización temprana acelerando la reparación de la mielina. Sin embargo, la expresión de la sema3A y de su receptor, la Np-1, estaban retardadas y se asociaban a una disminución en el reclutamiento de las OPC, sugiriendo que la sema3A podría actuar como señal de freno, después de que un número suficiente de precursores hayan sido atraídos hacia la lesión por la sema3F (Piaton *et al.*, 2011). Recientemente, tras estudiar diferentes tipos de lesiones de EM, se ha descrito que existe una correlación entre la expresión elevada de la sema3A y un escaso número de OPC en las lesiones crónicas activas, lo que indicaría que la sema3A impediría la migración de estas células y, por consiguiente, la remielinización (Boyd *et al.*, 2013). En la misma línea, otros autores también han demostrado una función inhibitoria de la sema3A en los procesos de remielinización (Syed *et al.*, 2011), observando que la presencia de la sema3A provoca un bloqueo reversible de la diferenciación de las OPC.

3.4.2. Sema7A

Al contrario que la sema3A, la sema7A no se ha estudiado tan ampliamente en el contexto de enfermedades autoinmunes ni neurológicas. En el líquido sinovial de pacientes con AR se ha demostrado la presencia de anticuerpos que reaccionan con el precursor de la sema7A, identificando a esta proteína como posible autoantígeno en la patogenia de la AR (Kim *et al.*, 2006). Por otro lado, un estudio reciente llevado a cabo por nuestro grupo, detectó que los niveles de la sema7A en el LCR de pacientes con un síndrome clínico aislado que convertían a EM estaban disminuidos respecto a los niveles de los pacientes que no convertían (Comabella *et al.*, 2010). El hecho de que los niveles de la sema7A se encuentren disminuidos en el LCR de pacientes que finalmente desarrollan EM sugiere que la forma soluble de la proteína podría tener alguna función biológica que queda sin resolver. Una hipótesis sería que los pacientes que convierten a una EM

clínicamente definida tendrían menor escisión de su proteína y, por tanto, más sema7A anclada a la membrana celular con lo que favorecería su función pro-inflamatoria en el SNC. Otra posibilidad sería que la forma soluble de la sema7A actuara como antagonista de la sema7A anclada a la membrana, como ocurre con otras muchas proteínas y receptores (Jones and Rose-John, 2002; Mohler *et al.*, 1993), de modo que al disminuir los niveles de la sema7A soluble, ésta no impediría la unión de la sema7A de membrana a sus receptores y mediaría la migración y la producción de citocinas en los macrófagos (Holmes *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2007).

Estos datos sugieren que la sema7A podría participar en la patogenia de la EM. Existen dos trabajos en la literatura, con resultados controvertidos, en los que se estudia el papel de la sema7A en la patogenia de la EM utilizando el modelo animal de la EAE. Czopik y colaboradores describieron a la sema7A como una proteína clave en la regulación de la respuesta inmune mediada por células T. Observaron en experimentos *in vitro* e *in vivo* que las células T deficientes en sema7A eran hiper-reactivas tras su activación (Czopik *et al.*, 2006). Además, estos autores describieron un curso clínico de EAE más severo en ratones deficientes en sema7A inmunizados con MOG₃₅₋₅₅, debido a una mortalidad superior que la que presentaban los ratones control (WT). Por el contrario, los animales WT así como los animales deficientes en sema7A que sobrevivieron presentaron una evolución clínica muy similar. También observaron un gran número de linfocitos infiltrantes en el SNC y niveles elevados de citocinas pro-inflamatorias en los ratones deficientes en sema7A respecto a los WT. Estos autores proponen que las citocinas pro-inflamatorias así como la generación de células T hiper-reactivas serían las responsables de la gran tasa de mortalidad observada en los animales deficientes en sema7A. Sin embargo, no describen una función específica para la sema7A en el SNC.

Por otro lado, Suzuki y colaboradores (Suzuki *et al.*, 2007) describieron que la sema7A es una molécula crítica en la fase efectora de la respuesta inmune mediada por células T. Estos autores demostraron que los ratones deficientes en sema7A desarrollaban una EAE más benigna que los ratones control, con pocos infiltrados inflamatorios en el SNC. Al inducir la EAE de manera pasiva transfiriendo

a ratones WT células T específicas para MOG₃₅₋₅₅ que no expresaban sema7A, los animales desarrollaron una EAE con un curso clínico menos grave que los que habían recibido células que expresaban sema7A. Debido a los resultados contradictorios de estos estudios, la implicación de la sema7A, tanto en la fase inflamatoria como neurodegenerativa de la EAE, está por resolver.

Todo lo descrito hasta el momento sugeriría que la sema3A y la sema7A podrían ser relevantes en la regulación de los procesos de neurodegeneración y neorregeneración del SNC así como de la respuesta inmune, lo que las convertiría en dianas terapéuticas potenciales para el tratamiento de la EM.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

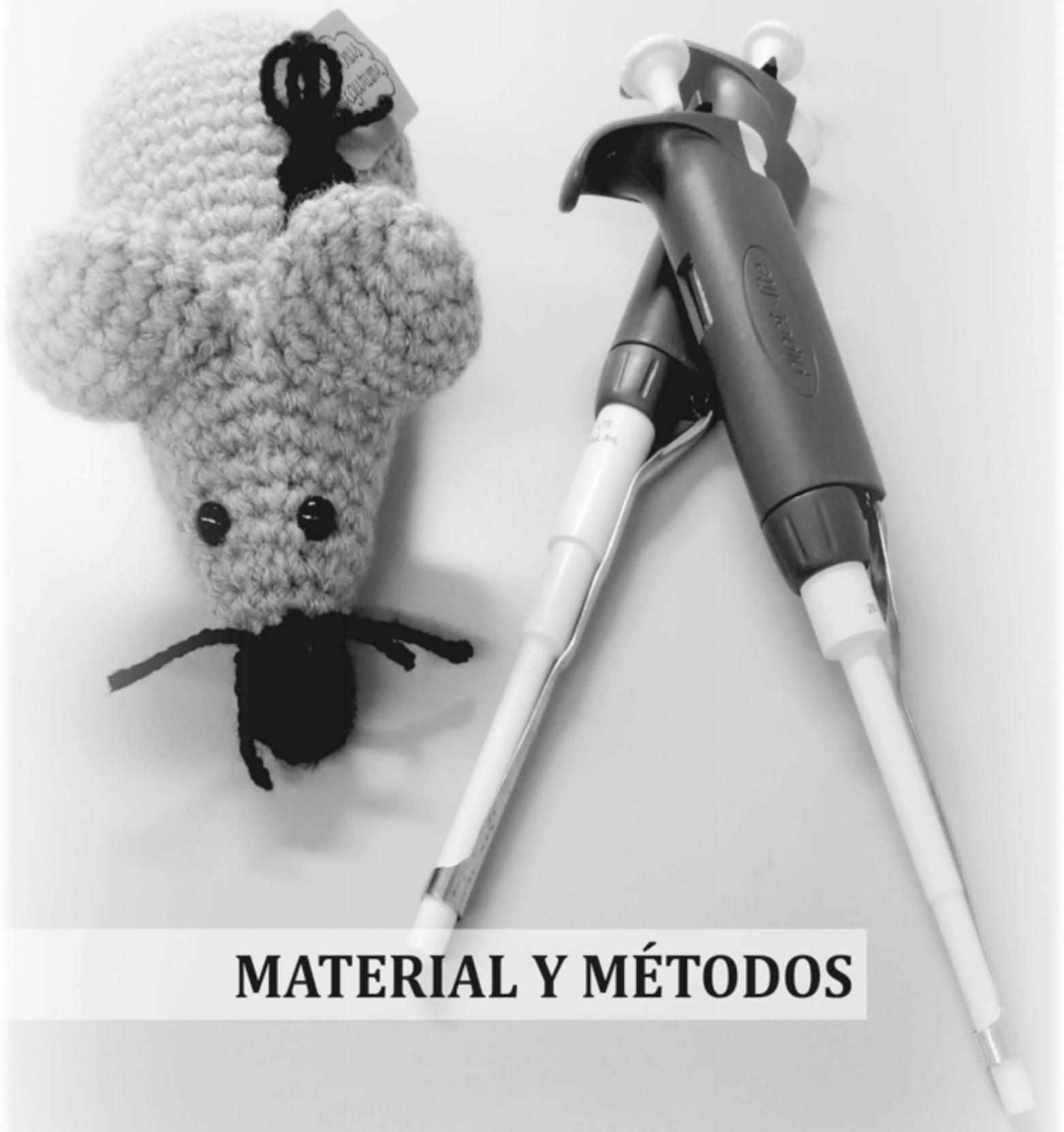
Hipótesis

La hipótesis general del estudio es que la sema3A y la sema7A participan en la regulación de la respuesta inmune y/o los procesos de neurodegeneración/neurorregeneración del SNC en la EM.

Objetivos

Con el objetivo general de estudiar la función de la sema3A y la sema7A en la patogenia de la EM y de valorar su potencial como posibles dianas terapéuticas en un modelo de EAE, planteamos los siguientes objetivos concretos:

1. Caracterizar la expresión de la sema3A, la sema7A y la de sus receptores (Np-1, PLXN-A1, α 1 y β 1-integrina) en lesiones de pacientes con EM.
2. Caracterizar la expresión de la sema3A, la sema7A y la de sus receptores (Np-1, PLXN-A1, α 1 y β 1-integrina) en el SNC y el sistema inmune en las diferentes fases de la EAE.
3. Estudiar la función de la sema7A *in vivo*, en la EAE:
 - 3.1. Caracterización clínica e histopatológica de la EAE en ratones deficientes en sema7A.
 - 3.2. Estudio de la respuesta inmunológica en ratones deficientes en sema7A con EAE.



MATERIAL Y MÉTODOS

1. ***Muestras de lesiones de pacientes con EM y controles***

Seleccionamos 77 áreas de SNC de 21 pacientes a los que se les había realizado un estudio neuropatológico post-mortem en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitari Vall d'Hebron, entre los años 1992 y 2009. Analizamos 44 lesiones desmielinizantes que provenían de cinco pacientes con EMRR, 12 lesiones desmielinizantes de ocho pacientes con un infarto agudo cerebral (AI) y 11 lesiones desmielinizantes de cuatro pacientes con LMP. Además, se analizaron 10 áreas de NAWM que procedían de cuatro pacientes sin enfermedad neurológica (NNC). Este estudio fue aprobado por el comité ético de investigación clínica del Institut de Recerca – Hospital Universitari Vall d'Hebron (número de procedimiento: PR(AG)187-2012).

Clasificación de las lesiones de EM

Hicimos secciones seriadas de 4 µm de grosor de los tejidos previamente fijados en formaldehído al 10% e incluidos en parafina. Se realizaron las tinciones de HE y de KB para estudiar respectivamente, el nivel de inflamación y de desmielinización, lo que nos permitió clasificar las lesiones de EM en: i) crónicas activas con alta actividad inflamatoria (CAHIA, n=13), cuando se observaba hipercelularidad, presencia de abundante infiltrado inflamatorio perivascular y en los bordes de la placa de desmielinización y desmielinización activa; ii) crónicas activas con baja actividad inflamatoria (CALIA, n=15), cuando presentaban hipocelularidad, escaso infiltrado inflamatorio perivascular y ausencia de desmielinización activa; iii) crónicas inactivas (CI, n=16), lesiones desmielinizantes que no presentaban infiltrado inflamatorio.

2. ***Encefalomielitis autoinmune experimental***

Animales

Utilizamos ratones de 8 semanas de edad C57BL/6 procedentes de Harlan Laboratories (Italia) o ratones de 5–10 semanas de edad C57BL/6 deficientes en sema7A (sema7AKO) y ratones sema7AWT, donados generosamente por el Dr. A. Kolodkin (Pasterkamp *et al.*, 2003).

Todos los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (20–22°C) y ciclos de luz–oscuridad de 12 horas con total accesibilidad a la comida

y el agua (*ad libitum*). Los experimentos se realizaron acorde con la regulación de la Unión Europea y la regulación gubernamental (Generalitat de Catalunya Decret 214/97 del 30 de Julio). Este estudio fue aprobado por el comité ético de experimentación animal (CEEA) del Vall d'Hebron Institut de Recerca (número de protocolo: 39/09). Se establecieron criterios de punto final para minimizar el sufrimiento y garantizar el bienestar animal. Todos los procedimientos llevados a cabo y los resultados obtenidos se han realizado y presentado en base a lo descrito en la guía para las publicaciones en EAE (Baker and Amor, 2012).

Establecimiento de la colonia de ratones sema7AKO en nuestro estabulario

Pasterkamp y colaboradores crearon el vector para la mutación que permitió generar un ratón deficiente en sema7A (Pasterkamp *et al.*, 2003). El Dr. A. Kolodkin nos cedió generosamente un macho y dos hembras de ratones sema7AKO homocigotos.

Por cuestiones sanitarias se tuvo que hacer una transferencia de embriones de ratones sema7AKO a hembras C57BL/6 pseudoembarazadas que se encontraban en un ambiente SPF. Este procedimiento fue realizado por personal especializado del estabulario del *Parc de Recerca Biomédica* de Barcelona. Tras obtener ratones sema7AKO en condiciones SPF se trasladaron a nuestro centro, donde se cruzaron con animales control C57BL/6 criados en condiciones SPF en nuestro estabulario. Hermanos de la primera descendencia heterocigota obtenida (F1) se cruzaron entre sí para obtener animales sema7AKO y sema7AWT, considerados fundadores de la colonia en nuestro centro.

Para llevar un control genético de la colonia genotipamos algunos animales de la descendencia una vez estuvieron establecidos los ratones fundadores para el genotipo WT y *knockout* (KO). Para ello, se extrajo una pequeña muestra de tejido procedente de la oreja del animal y se procesó con el kit *REDExtract* (Sigma, St Louis, MO, USA). Tras vortear e incubar la muestra con la solución de extracción (100 µl) junto con la solución de preparación del tejido (25 µl) a temperatura ambiente durante 10 minutos, se continuó con una incubación a 95°C durante 3 minutos. Por último, se añadió una solución de neutralización (100 µl). La solución

resultante se utilizó para amplificar el ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El volumen total de ADN extraído se almacenó a -20°C eliminando el tejido no disgregado.

Para la PCR utilizamos una solución de amplificación del mismo kit de extracción de ADN (*REDExtract-N-Amp PCR Reaction Mix*) que contiene todos los componentes necesarios para que se dé la amplificación del ADN extraído (sales, dNTPs, *Taq* polimerasa, tinte *REDTaq* y anticuerpo *JumpStart Taq*). Se utilizaron tres cebadores (Life-Technologies, Carlsbad, CA, USA) que reconocen regiones del constructo generado para crear los ratones *sema7AKO* tal y como se indican en la Figura 7.

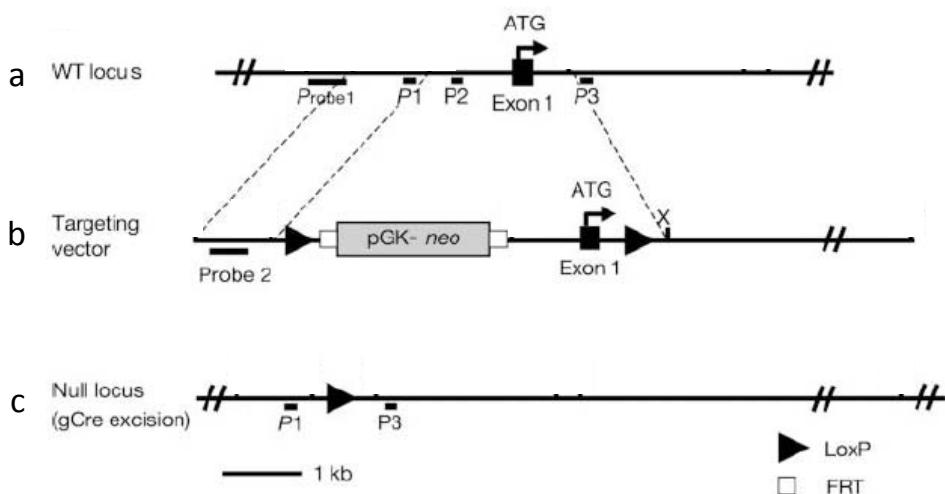


Figura 7. Esquema del gen de la *sema7A*, el vector diana que contiene una región homóloga y el casete para realizar la selección positiva por neomicina, así como las regiones de escisión por la recombinasa Cre, y el gen con el fragmento del primer exón de la *sema7A* deletado. P1, P2 y P3 son las regiones a la que los cebadores se unen en la reacción de PCR y que sirven para genotipar los animales. Figura modificada de (Pasterkamp *et al.*, 2003).

Los cebadores P1 y P2 amplifican una banda de 358 pares de bases (bp) correspondiente a una región *upstream* del primer exón del gen *sema7A*. Tras la recombinación del constructo con el ADN del animal WT para generar el ratón deficiente en *sema7A*, la región a la que se une el cebador P2 queda eliminada, de modo que la secuencia que se amplifica sería la comprendida entre los cebadores P1 y P3 que generan una banda de 513 bp correspondiente al alelo mutado (KO) (Figura 7).

- P1: Cre/Frt Forward–1: GGC CAC AGG ATT CAG TGC AGG CC
- P2: Frt Reverse–2: CCC ACA GAC CCA GAC ATA CTG AGC
- P3: Cre Reverse–1: CCC GCG TGC CAG CAG AGC TCG C

A pesar de que el cebador P1 esté implicado en ambas reacciones, la cantidad que se añade a la solución de reacción de PCR está a una concentración saturante, de modo que no es necesario poner el doble de cantidad de P1. El protocolo de hibridación para los tres cebadores fue el siguiente:

1. Preparar la siguiente mezcla de reacción en un tubo de 0,2 ml (en un volumen final de 20 µl):

- *REDExtract-N-Amp PCR Reaction mix* 10 µl
- Cebador P1 a 50 ng/ml 1,25 µl
- Cebador P2 a 50 ng/ml 1,25 µl
- Cebador P3 a 50 ng/ml 1,25 µl
- Agua libre de ribonucleasas 4,25 µl
- ADN extraído 2 µl

2. Poner el tubo en un termociclador:

Debido a la alta cantidad de citosinas y guaninas en los cebadores, la temperatura de hibridación entre la sonda y el ADN debe ser muy elevada. De este modo, la interacción es mucho más específica y se evita la amplificación inespecífica de otras regiones con secuencias parecidas.

El programa de temperaturas para la PCR siguió el siguiente esquema:

- Desnaturalización inicial de las cadenas de ADN 94°C 5' 1 ciclo
- Desnaturalización 94°C 1'
- Hibridación del cebador con el ADN 70°C 1' 35 ciclos
- Elongación de la cadena amplificada 72°C 1'
- Elongación final 72°C 10' 1 ciclo
- Fin de la PCR Almacenamiento a 4°C

Tras la amplificación por PCR, visualizamos los fragmentos mediante la separación del ADN por electroforesis en un gel al 2% de agarosa con 0,1% de bromuro de etidio que se intercala en los ácidos nucleicos del ADN y permite su detección cuando se expone a la luz ultravioleta. Gracias al uso de un marcador de peso

molecular se pudo observar si la banda amplificada correspondía a la del genotipo WT (358 bp), a la del KO (513 bp) o ver las dos bandas simultáneamente, correspondiendo a animales heterocigotos.

Inducción de la EAE

Anestesiamos los ratones mediante la administración intraperitoneal de 50 µl de una mezcla de 37 mg/kg de ketamina (*Ketolar*, Parke-Davis, Pfizer, Nueva York, NY, USA) y 5,5 mg/ml de xilacina (*Xilagesic*, Laboratorios Calier, Barcelona, España). Una vez anestesiados, los pesamos y les hicimos una marca identificativa en la oreja para poder realizar el seguimiento clínico individualizado. Posteriormente, inmunizamos a los animales subcutáneamente con una emulsión que contenía el antígeno encefalitogénico (50 µg/ratón de MOG₃₅₋₅₅, Sección de proteómica, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, España) y el adyuvante completo de Freund (CFA) [300 µg/ratón *Mycobacterium tuberculosis* (McT) H37RA, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Se administraron 50 µl en los cuatro flancos del animal, ventrales anteriores y posteriores (ingles y axilas). Además, se les administró 150 ng/ratón de toxina pertussis (Tp) (Sigma) por vía intravenosa (vena lateral de la cola) el mismo día de la inmunización y el día 2 post-inmunización (p.i.).

Para el estudio de la función de la sema7A en la patogenia de la EAE utilizamos diferentes protocolos de inmunización que variaron en la cantidad de antígeno y/o adyuvantes administrados:

- ° Dosis Lab: 50 µg MOG₃₅₋₅₅ + 300 µg McT + 150 ng Tp
- ° 1 µg: 1 µg MOG₃₅₋₅₅ + 100 µg McT + 100 ng Tp
- ° 10 µg: 10 µg MOG₃₅₋₅₅ + 100 µg McT + 100 ng Tp
- ° 50 µg: 50 µg MOG₃₅₋₅₅ + 100 µg McT + 100 ng Tp
- ° 100 µg: 100 µg MOG₃₅₋₅₅ + 100 µg McT + 100 ng Tp

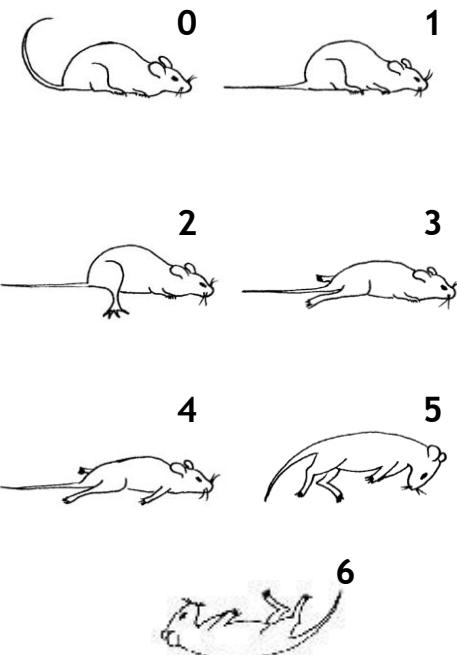
En todos los grupos incluimos ratones inmunizados de igual forma pero en ausencia del antígeno encefalitogénico, como control del proceso de inmunización.

Seguimiento clínico de la EAE

Diariamente pesamos y examinamos los signos clínicos neurológicos de los ratones mediante una escala clínica que permitía la valoración de una parálisis ascendente. El criterio de puntuación establecido se modificó ligeramente a partir del publicado anteriormente por nuestro grupo (Espejo *et al.*, 2001) para obtener una escala con mayor sensibilidad al cambio (Tabla 3). La pérdida de peso se calculó como la variación porcentual del peso diario comparado con el peso de cada animal en el día de inmunización.

Tabla 3. Criterio de puntuación clínica para valorar los signos clínicos en ratones con EAE.

		Puntuación clínica
0	1	Sin señales clínicas neurológicas
0,5		Paresia parcial de la cola (zona distal) durante dos días consecutivos
1		Parálisis total de la cola
2	3	Paraparesia trasera leve
2,5		Paraparesia trasera severa/paraplejia
3		Tetraparesia leve
4	5	Tetraparesia con afectación trasera grave
4,5		Tetraparesia severa
5		Tetraplejia (criterio de punto final)
6		Éxodo del animal por EAE



Para el estudio de la función de la sema7A en la patogenia de la EAE, el seguimiento clínico se hizo de forma ciega, es decir, el evaluador no conocía el genotipo ni el protocolo de inmunización de los animales.

Obtención del SNC de ratones con EAE

Los ratones se eutanasiaron mediante asfixia por CO₂ en diferentes momentos del curso clínico de la EAE para la caracterización de la expresión de las semaforinas

y de sus receptores: día 0 p.i. (tiempo basal); día 7 p.i. (fase de inducción); día 16 p.i. (fase inflamatoria); día 29 p.i. (fase crónica) (n=5, por punto temporal) o a final de experimento (día 34–36 p.i.) para el análisis histopatológico en el estudio de la función de la sema7A en la EAE (n=4–6/genotipo y protocolo de inmunización). En primer lugar extrajimos el encéfalo y la médula espinal que se fijaron con paraformaldehído (PFA) (Sigma) al 4% a 4°C. Tras 24 horas se hicieron tres lavados con tampón fosfato salino (PBS). Posteriormente, medio encéfalo (corte longitudinal) y media médula espinal (corte transversal) se incluyeron en parafina para realizar las tinciones de HE y KB así como para las inmunotinciones con un único marcador. Para los dobles marcas por inmunofluorescencia, la otra mitad del SNC, tras la fijación con PFA, se sumergió en una solución de sacarosa al 30% a pH 7,2–7,4 para crioprotégerlos antes de incluirlos en Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek Europe, Holanda) y congelarlos en nitrógeno líquido.

Evaluación de la infiltración celular y de la desmielinización en el SNC de ratones con EAE

El grado de infiltración celular lo cuantificamos en médula espinal mediante la tinción de HE siguiendo el siguiente criterio (Figura 8):

- 0: sin lesión
- 1: infiltración celular solo en las meninges
- 2: infiltrados superficiales y discretos en el parénquima
- 3: infiltración moderada (menos del 25%) en la sustancia blanca
- 4: infiltración severa (menos del 50%) en la sustancia blanca
- 5: infiltración muy severa (más del 50%) en la sustancia blanca

La desmielinización la evaluamos mediante la tinción de KB según la siguiente escala de puntuación (Figura 8):

- 0: sin desmielinización
- 1: poca desmielinización alrededor de los infiltrados, comprendiendo menos del 25% de la sustancia blanca
- 2: desmielinización que comprende menos del 50% de la sustancia blanca
- 3: desmielinización difusa y extendida que comprende más del 50% de la sustancia blanca

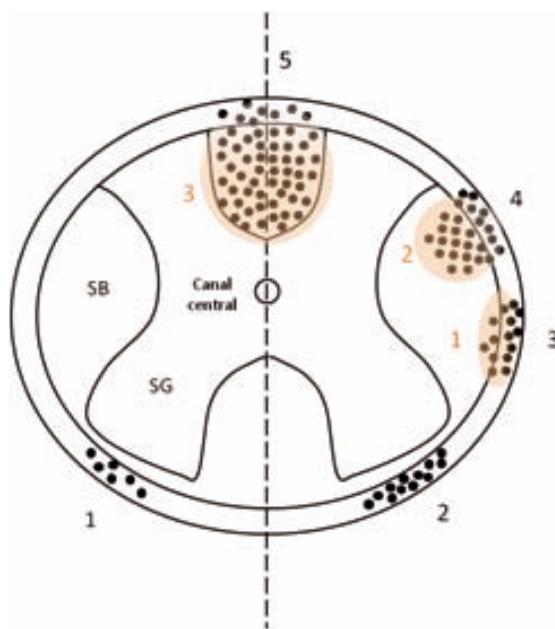


Figura 8. Esquema del criterio de evaluación utilizado para determinar el grado de infiltración celular (números en negro: 1, infiltración en meninges; 2, infiltración superficial en el parénquima; 3, infiltración moderada de la SB; 4, infiltración severa inferior al 50% de la SB; 5 infiltración muy severa superior al 50% en SB y posible afectación de la SG) y la desmielinización (números en naranja: 1, desmielinización inferior al 25% alrededor de los infiltrados; 2, desmielinización inferior al 50% de la SB; 3, desmielinización difusa y extendida superior al 50% de la SB) para el estudio histopatológico de la médula espinal de ratones con EAE. SB: sustancia blanca; SG: sustancia gris.

3. *Caracterización de la expresión de la sema3A, la sema7A y de sus receptores en el SNC de pacientes con EM y ratones con EAE*

Marcaje doble por inmunofluorescencia

Realizamos inmunomarcajes dobles para caracterizar la expresión de la sema3A, la sema7A y de sus receptores en diferentes poblaciones celulares del SNC (neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y microglía/macrófagos) y en linfocitos T y B del infiltrado inflamatorio.

Las secciones de las muestras del SNC de pacientes con EM y controles, las desparafinamos y bloqueamos las uniones inespecíficas con una solución al 2% de albúmina bovina serica (BSA) y 0,3% de Tritón X-100 (Sigma) en PBS. Cuando fue necesario realizamos desenmascaramiento antigénico con la incubación de las muestras en una solución de citrato a 10 mM (pH 6) o en tampón TE a pH 9 (Tabla 4). Las secciones se incubaron con los anticuerpos primarios a 4º C durante toda la noche (Tabla 4). Después de realizar tres lavados con PBS, los tejidos se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente (Tabla 5).

En las muestras del SNC de ratones con EAE la tinción se realizó en tejido previamente fijado en PFA al 4%, crioprotegido con sacarosa al 30%, incluido en *Tissue-Tek* O.C.T. y congelado en nitrógeno líquido. Las uniones inespecíficas las bloqueamos mediante una solución de PBS que contenía 3% de BSA y 0,3% de Tritón X-100. Las secciones de 10 µm de grosor se incubaron con los anticuerpos primarios a 4º C durante toda la noche (Tabla 4). Tras tres lavados con PBS, los tejidos se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente (Tabla 5).

Inmunohistoquímica para las semaforinas y sus receptores

Realizamos secciones seriadas de 4 µm de grosor de tejidos incluidos en parafina que adherimos a portaobjetos de vidrio pre-tratados con poli-L-lisina (Leica Microsystem Plus Slides, Leica Microsistemas S.L.U. Barcelona, España). Posteriormente, los tejidos se desparafinaron en xileno y se rehidrataron mediante una batería decreciente de alcoholes finalizando en PBS. La actividad peroxidasa endógena la inactivamos incubando los tejidos durante 20 minutos en una solución de PBS que contenía un 2% de peróxido de hidrógeno y un 70% de metanol. Cuando fue necesario, realizamos el desenmascaramiento de antígenos mediante la incubación en solución de citrato a 10 mM (pH 6) o en tampón EDTA (TE) (1M Tris-Cl (Sigma) + 1mM EDTA (Sigma) en agua destilada) a pH 9 (Tabla 4). Las uniones inespecíficas se bloquearon utilizando una solución de PBS al 2% de BSA. Los anticuerpos (Tabla 4) primarios se incubaron a 4ºC durante toda la noche. Tras realizar tres lavados con PBS, se incubó el anticuerpo secundario biotinado (Tabla 5) durante 1 hora a temperatura ambiente. Para visualizar la tinción añadimos un complejo de avidina-biotina-peroxidasa (*ImmunoPure ABC Peroxidase Satining kits*, Thermo Fisher Scientific Inc, Pierce Protein Biology Products, Rockford IL, USA) y el sustrato 3,3'diaminobencidina (DAB) (Sigma).

En las muestras de SNC de pacientes con EM y controles realizamos una valoración semicuantitativa de la expresión de la sema3A, la sema7A y de sus receptores en base a la intensidad del inmunomarcaje en cada tipo celular identificado por su morfología. Cada muestra fue evaluada de la siguiente manera:

- 0: sin tinción específica
- 1: intensidad de la tinción débil
- 2: intensidad de la tinción moderada
- 3: intensidad de la tinción fuerte

La valoración se hizo por dos investigadores en un microscopio de dos cabezales y de forma ciega, es decir, los evaluadores no conocían el tipo de muestra que estaban valorando.

En los animales con EAE, el recuento de células positivas para los marcadores en estudio se realizó en dos zonas diferenciadas: i) en el infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos y macrófagos infiltrantes, neutrófilos, microglía activada y astrocitos reactivos; ii) en la sustancia blanca perilesional compuesta por oligodendrocitos, axones, astrocitos reactivos y microglía (Figura 9). En cada zona se realizó el conteo de células positivas para cada marcaje en cinco áreas independientes de $0,25 \text{ mm}^2$ de la médula espinal para posteriormente calcular el porcentaje de células positivas en cada área respecto al número total de células.

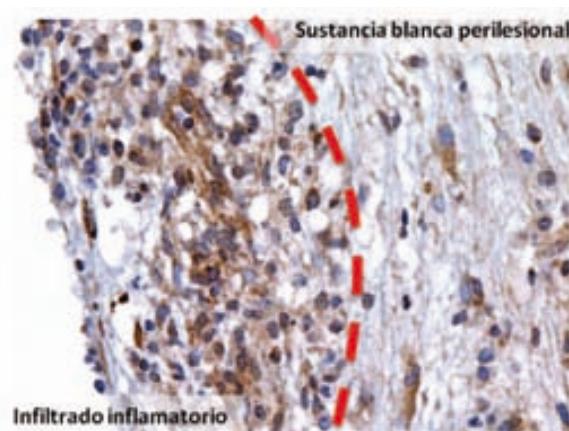


Figura 9. Sección longitudinal de la médula espinal de un ratón C57BL/6 con EAE a día 16 p.i. En la parte izquierda y delimitada por una línea roja punteada, se observa una región con células infiltradas que invade la sustancia blanca y la deteriora (infiltrado inflamatorio). En la parte derecha de la línea roja punteada se observa la sustancia blanca perilesional.

Tabla 4. Anticuerpos y condiciones utilizadas para los estudios de inmunohistoquímica en el SNC de pacientes con EM y controles y en el SNC de ratones con EAE.

Anticuerpos Primarios					
Diana	Reactividad	Anticuerpo	Referencia	Pre-tratamiento	Dilución
Sema3A	Humano	Anti-Sema3A de conejo	Abnova (PAB7888)	TE pH 9	1:200
	Ratón				1:100
Np-1	Humano, Ratón	Anti-Np-1 de conejo	Abcam (ab81321)	Citrato pH 6	1:100
PLXN-A1	Ratón	Anti-PLXN-A1 de conejo	Cell Signaling (3813)	Citrato pH 6	1:50
Sema7A	Humano, ratón	Anti-Sema7A de conejo	Abcam (ab23578)		1:150
α1-integrina	Humano	Anti-α1-integrin de conejo	Abgen (AP8841c)	Citrato pH 6	1:500
	Ratón				1:200
β1-integrina	Humano	Anti-β1-integrin de ratón	LSBio (LS-B2953)	Citrato pH 6	1:150
	Ratón	Anti-β1-integrin de conejo	Abcam (ab52971)	Citrato pH 6	1:100
PLXN-C1	Humano, ratón	Anti-PLXN-C1 de oveja	R&D Systems (AF5375)		1:50
Neuronas	Humano, ratón	Anti-NeuN-Cy3 de ratón	Millipore (MAB377C3)		1:200
	Humano	Anti-NeuN de conejo	Sigma (HPA030790)		1:100
Oligodendrocitos	Humano, ratón	Anti-Olig2 de cabra	R&D Systems (AF2418)		1:100
	Humano	Anti-Olig2 de conejo	Millipore (AB9610)		1:200
Astrocitos	Humano, ratón	Anti-GFAP-Cy3 de ratón	Sigma (C9205)		1:500
	Humano	Anti-GFAP de conejo	DakoCytomation (Z0334)		1:500
Macrófagos /microglía	Humano	Anti-CD68 de ratón	DakoCytomation (M0876)		1:100
	Humano	Anti-CD68 de conejo	Sigma (HPA048982)		1:100
	Ratón	Lectina de tomate	Sigma (L0651)		1:100
Células T	Humano	Anti-CD3 de conejo	DakoCytomation (A0452)		1:100
	Humano	Anti-CD3 de ratón	DakoCytomation (M725429)		1:100
	Ratón	Anti-CD3 de rata	eBioscience (14-0032-82)		1:100
Células B	Ratón	Anti-B220 de rata	eBioscience (14-00452-82)		1:100

Tabla 5. Anticuerpos secundarios utilizados en los estudios de inmunohistoquímica en lesiones de pacientes con EM y controles y en el SNC de ratones con EAE.

Anticuerpos secundarios		
Anticuerpo	Referencia	Dilución
Anti-conejo biotinado de cabra	DakoCytomation (E0432)	1:200
Anti-ratón biotinado de cabra	DakoCytomation (E0433)	1:200
Anti-ratón Alexa 488 de cabra	Life Technologies (A11029)	1:200
Anti-conejo Alexa 488 de cabra	Life Technologies (A11034)	1:200
Anti-cabra Alexa 594 de burro	Life Technologies (A11058)	1:200
Anti-ratón Alexa 568 de cabra	Life Technologies (A11031)	1:200
Anti-conejo Alexa 488 de cabra	Life Technologies (A11011)	1:200
Anti-oveja biotinado de burro	R&D Systems (BAF016)	1:5000

4. *Caracterización de la expresión de la sema3A, la sema7A y de sus receptores en el sistema inmune de ratones con EAE y estudio de la respuesta inmunológica en ratones deficientes en sema7A con EAE*

Con el propósito de caracterizar la expresión de las semaforinas y de sus receptores en las poblaciones celulares del sistema inmune con mayor relevancia en la patogenia de la EM/EAE, se testaron los anticuerpos disponibles en ese momento para su detección por citometría de flujo. Tras establecer las condiciones óptimas, aquellas moléculas que no se pudieron detectar por esta técnica, las estudiamos mediante western blot en el conjunto de células inmunes obtenidas a partir del bazo de los ratones. También se analizó la expresión génica de la sema3A y la sema7A por PCR cuantitativa (qPCR).

Obtención de células del sistema inmune

Para caracterizar la expresión de las semaforinas y de sus receptores en las células del sistema inmune, obtuvimos una suspensión celular a partir de los bazos de los ratones que previamente fueron eutanasiados mediante CO₂ en diferentes fases de la EAE: día 0 p.i. (tiempo basal); día 7 p.i. (fase de inducción); día 16 p.i. (fase inflamatoria) y día 29 p.i. (fase crónica); incluyendo cinco animales en cada una

de las fases estudiadas. Para ello, se realizó una laparotomía abdominal que permitió la extracción del bazo. Se transfirió a un *eppendorf* de 1,5 ml con medio de cultivo y posteriormente se disgregó de manera mecánica sobre un filtro de nylon de 0,70 μm (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA). La suspensión se transfirió a un tubo de 50 ml y se ajustó el volumen hasta 20 ml con suero fisiológico (SF) que contenía 10% de suero bovino fetal (FBS). Tras centrifugar las muestras a 1500 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lisaron los eritrocitos con 1 ml de agua destilada estéril. Éste es un paso crítico ya que si nos excedemos en la lisis, pueden resultar afectados los linfocitos y el resto de células inmunes. Inmediatamente después, se ajustó el volumen a 20 ml con SF al 10% de FBS y se volvió a centrifugar. El *pellet* de células se resuspendió en 1 ml de medio completo [medio de cultivo Dulbecco modificado de Iscove (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) que contenía 12,5% v/v de *Foetal Clone I Serum Hyclone* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 2 mM de L-Glutamina (Life Technologies, Gibco BRL, Paisley, Reino Unido), 1% v/v de penicilina-estreptomicina (Life Technologies, Gibco BRL) y 80 nM de 2- β -mercaptoetanol (Sigma)]. Tras contar el número de células obtenidas de cada bazo, se sembraron en tubos de cristal a una concentración de 2×10^6 células/ml en medio completo. La expresión de semaforinas inmunes se ha descrito principalmente en células inmunes activadas por lo que se optimizó el protocolo de estimulación. Se probó el estímulo con fitohemaglutinina (PHA), acetato de forbol miristato (PMA) e ionomicina o con lipopolisacárido (LPS) (todos ellos de Sigma). Tras escoger la activación con 50 ng/ml de PMA y 1 μM de ionomicina, se compararon dos tiempos de activación, 4 y 24 horas. Finalmente, se optó por el protocolo de estimulación con PMA e ionomicina durante 24 horas. Se inhibió la vía de secreción proteica añadiendo 2 μM de monensina durante las últimas seis horas de la estimulación (*Golgi Stop*, BD Biosciences).

Citometría de flujo

Se probaron anticuerpos específicos para la detección de la sema3A, la sema7A y de sus receptores. Sin embargo, para algunos de ellos no estaba descrito su uso en citometría de flujo y no se consiguieron las condiciones adecuadas para esta

aplicación. De esta manera se descartó el análisis mediante citometría de flujo de la sema3A (Abcam, Cambridge, UK), la PLXN-A1 (Abcam) y la PLXN-C1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Mediante citometría de flujo pudimos estudiar la expresión de la Np-1 (receptor de sema3A), la sema7A y la β 1-integrina (CD29) en esplenocitos estimulados con PMA e ionomicina durante 24 horas.

- *Inmunomarcaje de moléculas de superficie o intracelulares*

Tras lavar las células con PBS al 1% de BSA y 0,1% de azida sódica (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA) (PBA-Azida) se bloquearon los receptores de Fc con 1 μ l/ 10^6 células del anticuerpo anti-CD16/32 (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA, USA) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se incubaron 30 minutos a 4°C en oscuridad con los anticuerpos para las moléculas expresadas en la superficie celular (Tabla 6). Tras un lavado con PBA-Azida, se permeabilizaron las células con 250 μ l de *Cytofix/Cytoperm 1X Solution* (BD Bioscience) durante 20 minutos a 4°C y oscuridad. Las células se lavaron con PBA-Azida y se volvió a bloquear con 1 μ l/ 10^6 células del anticuerpo CD16/32. Se incubaron las células con los anticuerpos para las moléculas intracelulares (Tabla 6). Tras un lavado con *PermWash* (BD Biosciences), se añadió el correspondiente anticuerpo secundario para aquellos anticuerpos primarios que no estaban conjugados con un fluorocromo (Tabla 6). Para finalizar el inmunomarcaje, se hizo un lavado con *PermWash* y las células se resuspendieron en 250 μ l de PBA-azida. La adquisición de las células se hizo mediante un citómetro de flujo *FACSCanto* (BD Bioscience) que permite la detección de seis fluorocromos de manera simultánea.

Tabla 6. Anticuerpos e isotipos utilizados en la citometría de flujo para la caracterización de la expresión de la sema3A, sema7A y sus receptores en las células inmunes durante la EAE.

Marcaje	Anticuerpo	Referencia	Fluorocromo	µg por 10 ⁶ células	Isotipo
Marcaje de superficie	Anti-CD3e de ratón	eBioscience (45-0031-82)	PerCP-Cy5.5	0,25	IgG de hámster armenio
	Anti-CD4 de ratón	BD Pharmingen (557307)	FITC	1	IgG2b,k de rata
	Anti-CD8a de ratón	eBioscience (47-0081-82)	APCeFluor780	0,25	IgG2a,k de rata
	Anti-CD45 de ratón	BD Pharmingen (550994)	PerCP-Cy5.5	0,25	IgG2b,k de rata
	Anti-CD11b de ratón	eBioscience (25-0112-81)	PE/Cy7	1	IgG2b,k de rata
	Anti-CD11c de ratón	eBioscience (47-0112-80)	APCeFluor780	1	IgG de hámster armenio
	Anti-B220 de ratón	BD Pharmingen (552772)	PE/Cy7	0,25	IgG2a,k de rata
	Anti-CD5 de ratón	BD Pharmingen (553021)	FITC	0,5	IgG2a,k de rata
Marcaje intracelular	Anti-sema3A de ratón	Abcam (ab23393)	Purificado	0,5-1	IgG Chip grade de conejo
	Anti-plexina-A1 de ratón	Abcam (ab92346)	Purificado	2-5 µl de sobrenadante 1:50	IgG Chip grade de conejo
	Anti-plexina-C1 de ratón	R&D Systems (AF5375)	Purificado	8	IgG de cabra
	Anti-Neuropilina-1 de ratón	R&D Systems (FAB566A)	APC	0,4	IgG de cabra
	β1-integrina (anti-CD29) de ratón	eBioscience (12-0291-81)	PE	1	IgG de hámster armenio
	Anti-sema7A de ratón	TransGenic Inc. (KO402)	Purificado	0,01	IgG1,k de rata
Anticuerpos secundarios	Anti-IgG1 de ratón	BD Pharmingen (560089)	APC	0,01	IgG1,k de rata LOU
	Anti-IgG-H&L de conejo	Abcam (ab97070)	PE	1	Políclonal de cabra
Bloqueo receptores Fc	Anti-CD16/32	BD Pharmingen (553142)	Purificado	1	IgG2b,k de rata

- *Análisis y cuantificación*

El análisis de los resultados se realizó mediante el programa informático *BD FACSDiva* (BD Bioscience Software). En primer lugar y en todos los casos se combinaron los parámetros FSC (tamaño celular) y SSC (complejidad celular) para definir la población de células que pasan a través del flujo de manera individual (singletes). A partir de esta selección, se delimitó la población celular a estudiar por su morfología (Figura 10).

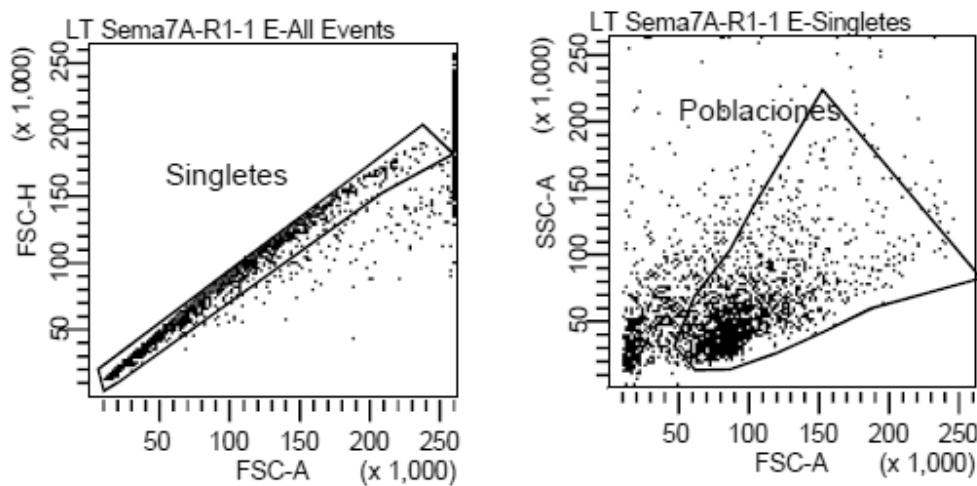


Figura 10. Selección de células individuales (singletes) y de la población de estudio mediante histograma biparamétrico que muestra FSC y SSC.

Posteriormente, se combinaron los distintos parámetros en función del marcaje realizado. Los resultados se expresaron como la media del porcentaje de células positivas para cada marcador en cada una de las poblaciones estudiadas. Las poblaciones celulares en las que se determinó la expresión de la Np-1, la sema7A y la β 1-integrina fueron las células T CD4+ (CD3+CD8-), células T CD8+ (CD3+CD8+), células B T-independientes (B1: CD45+CD5+B220+), células B T-dependientes (B2: CD45+CD5-B220+), células mieloides (CD45+CD11b+) y células dendríticas (CD45+CD11b+CD11c+).

Western Blot

Mediante western blot estudiamos la expresión de la sema3A y la PLXN-A1, no siendo posible establecer las condiciones óptimas para la detección de la PLXN-C1 y la α 1-integrina, que finalmente no se estudiaron. A partir de esplenocitos

activados con PMA e ionomicina se realizó la extracción proteica de 5×10^6 de células. Tras un lavado con PBS, se procedió a realizar la lisis celular con una solución compuesta por 1M de Tris-Cl a pH 7,2, 5M de NaCl (Panreac, Barcelona, España), 0,5 M de EDTA, 1% v/v de Tritón X-100 y 10% v/v de glicerol (Sigma), a la que se añadió una mezcla de inhibidores de proteasas (*Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail tablets*, Roche, Basel, Suiza). La concentración de proteínas en cada muestra la determinamos utilizando el método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y usando como curva patrón una dilución seriada (1:2) desde 20 µg/ml hasta 0 µg/ml de BSA. Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 7,5% separamos 10 µg de proteína para detectar la PLXN-A1 o 30 µg de proteína para detectar la sema3A, durante 90 minutos a 100 V constantes. Las muestras se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) y se bloqueó durante 1 hora con una solución de leche desnatada en polvo diluida al 5% en solución salina tamponada con solución Tris con 0,1% de *Tween20* (Sigma) (TBST) para la detección de la sema3A, y con leche desnatada en polvo al 10% en TBST para la detección de la PLXN-A1. La membrana se incubó a 4°C durante toda la noche con los anticuerpos primarios (Tabla 7). Después de realizar varios lavados con TBST, la membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con la peroxidasa de rábano (HRP). Tras eliminar el excedente de anticuerpo mediante lavados con TBTS, procedimos a visualizar las bandas correspondientes a las proteínas en estudio usando como sustrato el reactivo *Luminata Forte Western HRP* (Millipore, Billerica, MA, USA). La quimioluminiscencia emitida se capturó mediante una cámara acoplada a un ordenador (*ImageQuant LAS7000*, GE Healthcare, Reino Unido). La cuantificación de las bandas observadas la realizamos con el programa informático *Science Lab 2001 Image Gauge V4.0* (Fuji Photo Film CO., LTD, Tokyo, Japón) mediante la sustracción de la intensidad del fondo de la membrana a la intensidad de la banda específica y obteniendo ratios normalizados respecto a la intensidad de la señal de la actina. La especificidad de las bandas detectadas para la sema3A se confirmó al no observar ninguna de ellas tras la incubación del anticuerpo primario con el péptido inmunogénico (1:500) proporcionado por el mismo distribuidor (Abcam, ab134599).

No conseguimos las condiciones adecuadas para detectar la $\alpha 1$ -integrina ni la PLXN-C1 mediante western blot tras probar diferentes condiciones y anticuerpos (Tabla 7).

Tabla 7. Anticuerpos utilizados para la caracterización mediante western blot de la expresión de la sema3A, la PLXN-A1, la $\alpha 1$ -integrina y la PLXN-C1 en las células inmunes durante la EAE.

Anticuerpo	Referencia	Dilución
Conejo anti-sema3A de ratón	Abcam (ab23393)	1:200
Conejo anti-PLXN-A1 de ratón	Abcam (ab92346)	1:200
Conejo anti-actina	Sigma (A5060)	1:200
Conejo anti- $\alpha 1$ -integrina de ratón	Abnova (AP8814c)	1:500
	Abcam (ab106267)	1:500
	United States Biological (PA1045)	1:250
Cabra anti-PLXN-C1 de ratón	R&D Systems (AF5375)	1:1000
Burro anti-IgG de cabra biotinilado	R&D Systems (BAF016)	1:5000
Anti-IgG de conejo conjugado con HRP	Cell Signaling (7074S)	1:5000

Estudio de la expresión génica

Para evaluar la expresión génica de la sema3A y la sema7A en las células del sistema inmune en las diferentes fases de la EAE se siguió el siguiente protocolo:

- *Extracción de ARN*

Realizamos la extracción de ARN de 5×10^6 de esplenocitos activados con PMA e ionomicina usando el kit comercial *RNeasy Mini kit* (Qiagen, Hilden, Alemania). Tras lavar las células con PBS, se aplicó una solución de lisis que contenía 350 μ l de la solución RTL y 3,5 μ l de β -mercaptoetanol. El lisado celular se pipeteó en una columna *QIAshredder* para eliminar los restos celulares. Se añadió 350 μ l de etanol al 70% al homogeneizado y se mezcló por pipeteo hasta no diferenciar las dos fases. Transferimos la muestra a una columna *RNeasy spin* que retiene los ácidos nucleicos y permite eliminar el líquido sobrante. Se añadió 80 μ l de una endonucleasa (*DNAse set*, libre de ribonucleasas) sobre la membrana de la columna para eliminar los restos de ADN que pudieran quedar y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron una serie de lavados aplicando

primero 350 µl de la solución de lavado RW1 y descartando el eluido, y posteriormente aplicando 500 µl de la solución RPE y descartando el eluido. Para obtener la muestra de ARN concentrado, se aplicaron 15 µl de agua libre de ribonucleasas a la membrana y se centrifugó durante 1 minuto a alta velocidad (10000 rpm). Finalmente, cuantificamos la cantidad de ARN purificado mediante espectrometría de absorción (*Nanodrop*, ND-1000 Spectrophotometer, programa informático asociado *Nanodrop 1000V3.80.*)

- *Retro-transcripción del ARN a ADNc*

La retro-transcripción inversa genera una cadena de ADN complementaria (ADNc) a partir del ARN extraído. Para ello preparamos una mezcla conformada por 4 µl de una retro-transcriptasa comercial (*High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix*, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) que contiene todos los componentes necesarios para producir la nueva cadena de ADN, 0,125 ng de ARN extraído y agua libre de ribonucleasas, hasta conseguir un volumen igual a 20 µl.

- *Amplificación por qPCR*

Utilizando los cebadores que amplifican los genes de la sema3A, la sema7A y de la peptidil prolil isomerasa B (PPIB) (todos ellos de Thermo Fisher Scientific), junto con el reactivo mezcla que contiene todos los componentes para la PCR (*Rox MasterMix*, Thermo Fisher Scientific) llevamos a cabo la amplificación por PCR:

◦ <i>Solaris qPCR Gene Expression ROX Master Mix (2x)</i>	12,5 µl
◦ <i>Pre-designed Solaris qPCR Gene Expression Assay (20x)</i>	1,25 µl
◦ Agua libre de ribonucleasas	8,25 µl
◦ ADNc de la muestra	3 µl

- *Ánálisis de los resultados por qPCR*

Los resultados de una qPCR nos proporcionan valores de Ct que equivale al ciclo donde la curva de amplificación cruza el umbral de amplificación, normalmente en la parte lineal. Mediante el programa informático *SDS 2.3* (Applied Biosystems) realizamos el análisis de los resultados de la cuantificación relativa por qPCR. Escogimos como control endógeno de la expresión constitutiva de las células el gen PPIB por tener una expresión más parecida a la de los genes de estudio y por mantener su expresión constante en las fases estudiadas de la EAE. Los niveles de expresión de la sema3A y la sema7A se normalizaron frente a los valores de

expresión para PPIB. Como calibrador, se utilizaron las muestras a tiempo basal. Los niveles de expresión génica relativos se calcularon utilizando el método conocido como $2^{-\Delta\Delta CT}$. Para ello, primero calculamos el ΔCt restando al Ct del gen de interés el Ct del control endógeno. En segundo lugar, se calculó el $\Delta\Delta Ct$ restando al ΔCt de la fase de la enfermedad que se estaba comparando el ΔCt del calibrador, en este caso, el momento basal. La cuantificación relativa, o lo que es lo mismo, las veces que aumenta o disminuye la expresión génica la calculamos mediante la operación matemática $2^{-\Delta\Delta CT}$. Normalmente se considera significativa una tasa de cambio igual o superior a 2 en el caso de un aumento de expresión, o una tasa de cambio de 0,5 o inferior cuando disminuye.

Estudio de la respuesta inmunológica en ratones deficientes en sema7A con EAE

- *Cuantificación de la proliferación celular en esplenocitos*

Para los ensayos inmunológicos estudiamos entre cuatro y seis animales por genotipo y por protocolo de inmunización. Tras eutanasiar a los animales a día 12 p.i. y procesar los bazos para la obtención de los esplenocitos como se ha descrito anteriormente, las células se sembraron en placas de 96 pocillos con fondo en "U" (LabClinics, Nunclon, Barcelona, España) a una concentración de 2×10^5 células/pocillo en medio completo en presencia de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del péptido inmunogénico MOG₃₅₋₅₅ (Sección de proteómica, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, España) o en presencia de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PHA (Sigma), un estímulo inespecífico que genera una respuesta policlonal. Las células en medio de cultivo sin estímulo se tomaron como control basal de estimulación. Tras 48 horas, se recogieron 50 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ de sobrenadante del cultivo celular que se almacenaron a -80°C para la posterior cuantificación de citocinas secretadas al medio. Las células se incubaron en presencia de 1 $\mu\text{Ci}/\text{pocillo}$ de [³H]-Timidina (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) durante 18 horas más. Los niveles de radioactividad incorporados por las células en división (proliferación) que se encontraban dividiéndose se cuantificó mediante un contador beta de centello (Wallac, Turku, Finlandia). Para cada animal y condición de cultivo se realizaron 5 réplicas. Los resultados se expresaron como la media de las cuentas por minuto (cpm).

- *Cuantificación de las citocinas liberadas al medio de cultivo*

A partir del sobrenadante del cultivo celular del ensayo de proliferación de esplenocitos, se cuantificó la concentración de citocinas secretadas al medio tras la activación antígeno específica con el péptido MOG₃₅₋₅₅. Para ello se utilizó el kit comercial *BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit* (BD Biosciences) que permite detectar las siguientes citocinas: IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α, IL-17A e IL-10. Este tipo de análisis se basa en esferas que están recubiertas de anticuerpos específicos para las citocinas mencionadas (Figura 11). Los diferentes tipos de esferas se diferencian entre ellas por la intensidad de fluorescencia emitida del fluorocromo interno al que están conjugadas (Figura 11,12). En primer lugar preparamos la curva patrón transfiriendo las esferas a un tubo de 15 ml y reconstituyéndolas en 2 ml del diluyente proporcionado en el kit dejándolo incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizó un banco de diluciones seriadas con un factor de dilución 1:2 (1, 1:2, [⋯], 1:128, 1:256), donde el valor 0 pg/ml correspondía al diluyente sin esferas. Después se preparó la mezcla de las esferas marcadas individualmente para cada citocina añadiendo 10 µl de cada una de ellas por cada muestra a estudiar. Durante dos horas y protegido de la luz, se incubaron 50 µl del sobrenadante del cultivo celular junto con 50 µl de la mezcla de esferas preparada y 50 µl del reactivo de detección marcado con un fluorocromo distinto al que las esferas tienen internamente. Transcurrida la incubación, añadimos 1 ml de la solución de lavado. Tras centrifugar durante 5 minutos a 200 g, descartamos el sobrenadante cuidadosamente y resuspendimos en 300 µl de la solución de lavado. Mediante la adquisición por citometría de flujo y el análisis con el programa informático *FCAP Array* (BD Biosciences) calculamos las concentraciones de las citocinas estudiadas (pg/ml) gracias a la interpolación de los valores en la curva patrón.

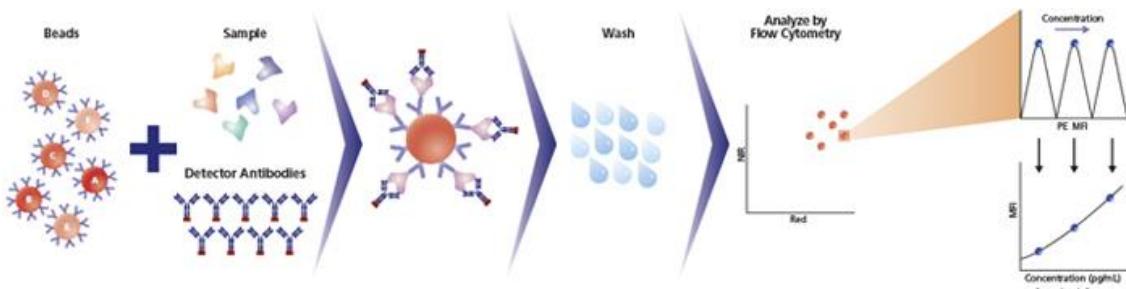


Figura 11. Esquema del procedimiento a seguir para la cuantificación de citocinas a partir del sobrenadante de un cultivo celular. Cada esfera está recubierta con un anticuerpo específico que reconoce un solo tipo de analito, en este caso una citocina, y tiene una intensidad de fluorescencia única. Después de que las citocinas presentes en la muestra se unan de manera específica a las esferas, se añade un reactivo que contiene anticuerpos específicos contra las citocinas marcados con un fluorocromo diferente al interno de las esferas. Al analizar los resultados obtenidos por citometría de flujo, las citocinas estudiadas se pueden separar por la intensidad de fluorescencia inherente de cada esfera, mientras que la cantidad de citocina presente en la muestra se cuantifica al valorar la mediana de la intensidad del fluorocromo del anticuerpo de detección. Imagen tomada de <http://www.bdbioscience.com>.

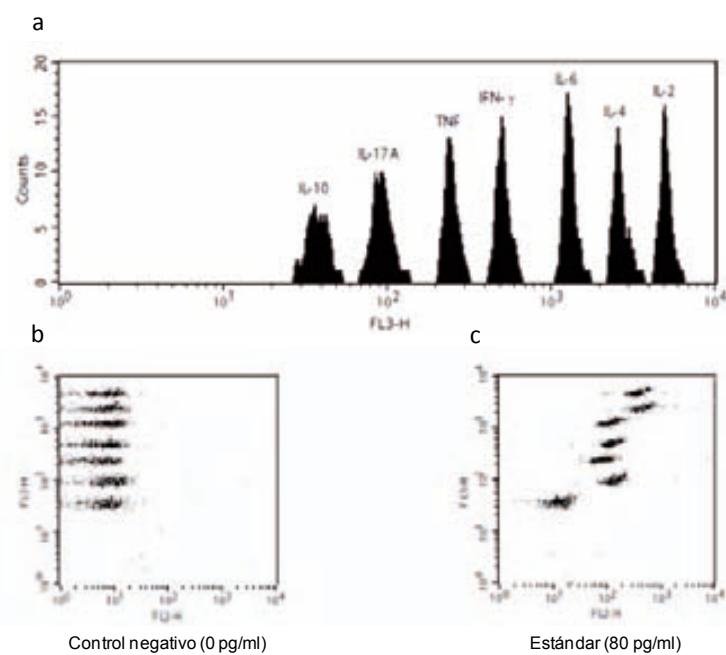


Figura 12. Histograma en el que se pueden detectar las siete poblaciones de esferas correspondientes a las citocinas en estudio según la diferencia en la intensidad de fluorescencia del fluorocromo interno (a). En el histograma biparamétrico se observa como las poblaciones permanecen en la misma posición al no detectar ninguna citocina en el control negativo (b) y cómo se desplazan al añadir una muestra estándar de 80 pg/ml (c). Imagen tomada del manual de instrucciones de <http://www.bdbioscience.com>.

5. Análisis estadístico

Analizamos los datos obtenidos mediante los programas informáticos *SAS 9.2* para Windows (SAS Inc., Cary, NC, USA), *GraphPad Prism v5.0* (GraphPad software, Inc., La Jolla, CA, USA) o el programa informático *R 3.0.2*. (<http://www.r-project.org/>). Según las variables a analizar y la distribución de las mismas se usaron diferentes pruebas estadísticas.

Ya que en el estudio de la caracterización de la expresión de semaforinas y sus receptores en lesiones de pacientes con EM se obtuvieron resultados de carácter ordinal, el análisis estadístico para el estudio semi-cuantitativo de la intensidad de la tinción de los marcadores en las diferentes lesiones en SNC, realizamos mediante pruebas no paramétricas. Con el test de Kruskal-Wallis evaluamos las diferencias de expresión entre los diferentes tipos celulares y entre las enfermedades estudiadas. Se aplicaron técnicas para ajustar el nivel de significancia para las comparaciones pareadas.

En la caracterización de las moléculas en estudio en las diferentes fases de la enfermedad en el modelo animal, comparamos la expresión de las mismas respecto el estado basal o respecto la fase de inducción cuando se evaluó la histopatología en el infiltrado inflamatorio, mediante un análisis de la varianza (ANOVA) y aplicando la prueba post-hoc de Dunnet.

Para el estudio de la mortalidad y la incidencia en los experimentos con animales sema7AKO y WT realizamos tablas de contingencia y se aplicó la prueba exacta de Fisher. Las variables del curso clínico de la EAE tales como día de inicio, puntuación acumulada, puntuación máxima y pérdida de peso las analizamos mediante una prueba *t* de Student si mostraban distribución normal o su prueba equivalente no paramétrica U de Mann-Whitney si la distribución de la variable no era normal. Se realizaron curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) para estudiar el tiempo que los animales tardaban en alcanzar una puntuación de 4 según el protocolo de inmunización utilizado. Para la valoración de la infiltración y desmielinización en el SNC de los ratones las puntuaciones de infiltración y desmielinización se compararon mediante una prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Para comparar los niveles de proliferación, así como los niveles de citocinas secretadas

aplicamos la prueba *t* de Student o la prueba no paramétrica Mann–Whitney según la normalidad de los datos.

En todos los casos se consideró que la diferencia era estadísticamente significativa cuando la *p* resultó inferior a 0,05.



Capítulo 1. Caracterización de la expresión de la sema3A, la sema7A y de sus receptores en lesiones de pacientes con EM

1. Expresión de la sema3A, la sema7A y sus receptores en diferentes tipos celulares del SNC en la EM

Caracterizamos la expresión de la sema3A, la Np-1, la sema7A, la α 1-integrina y la β 1-integrina en diferentes tipos celulares mediante inmunotinciones dobles en las lesiones CAHIA de EM tanto en la sustancia gris como en la sustancia blanca de apariencia normal. No conseguimos las condiciones adecuadas para la detección de la PLXN-A1 y la PLXN-C1.

En las lesiones de EM, la sema3A y su receptor, la Np-1, se detectaron en microglía/macrófagos, mientras que los astrocitos solo expresaron la sema3A (Figura 13). Por otro lado, los astrocitos reactivos expresaron la sema7A y sus receptores mientras que la microglía/macrófagos solo expresaron la β 1-integrina (Figura 14). Los linfocitos T infiltrantes (CD3+) no mostraron colocalización con ninguno de los marcadores de estudio (Figura 13,14).

En la SGAN, las neuronas expresaron la sema3A mientras que solo de manera ocasional expresaron la sema7A y la α 1-integrina (Figura 13,14).

En la SBAN se localizó la expresión de la sema7A y la α 1-integrina en oligodendrocitos (Figura 14).

2. Expresión de la sema3A, la sema7A y sus receptores en las lesiones de pacientes con EM y controles

Estudiamos la expresión de la sema3A, la sema7A y la de sus receptores en muestras de pacientes con EM y se compararon con muestras de pacientes con otras enfermedades que cursan con desmielinización (AI y LMP) así como con muestras de pacientes sin afectación neurológica (NNC). También comparamos los cambios en la expresión de estas proteínas en lesiones crónicas de EM con diferentes grados de actividad inflamatoria (CAHIA, CALIA, y CI) (Figura 15,17).

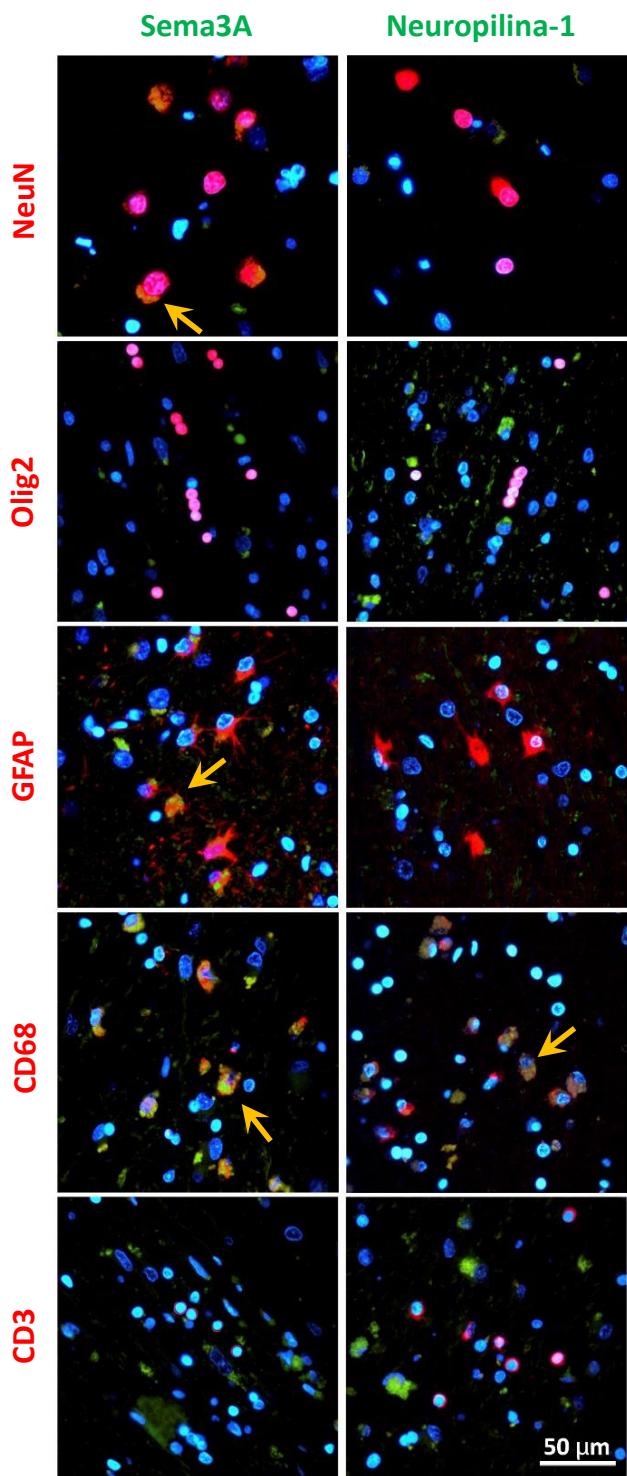


Figura 13. Expresión de la sema3A y la Np-1 en diferentes tipos celulares en lesiones crónicas activas de pacientes con EM. Las flechas indican las células que colocalizan para la sema3A o la Np-1 y los marcadores de las diferentes poblaciones celulares estudiadas: NeuN (neuronas), Olig2 (oligodendrocitos), GFAP (astrocitos), CD68 (microglía/macrófago) y CD3 (células T). Los núcleos celulares se visualizan en azul mediante tinción con DAPI.

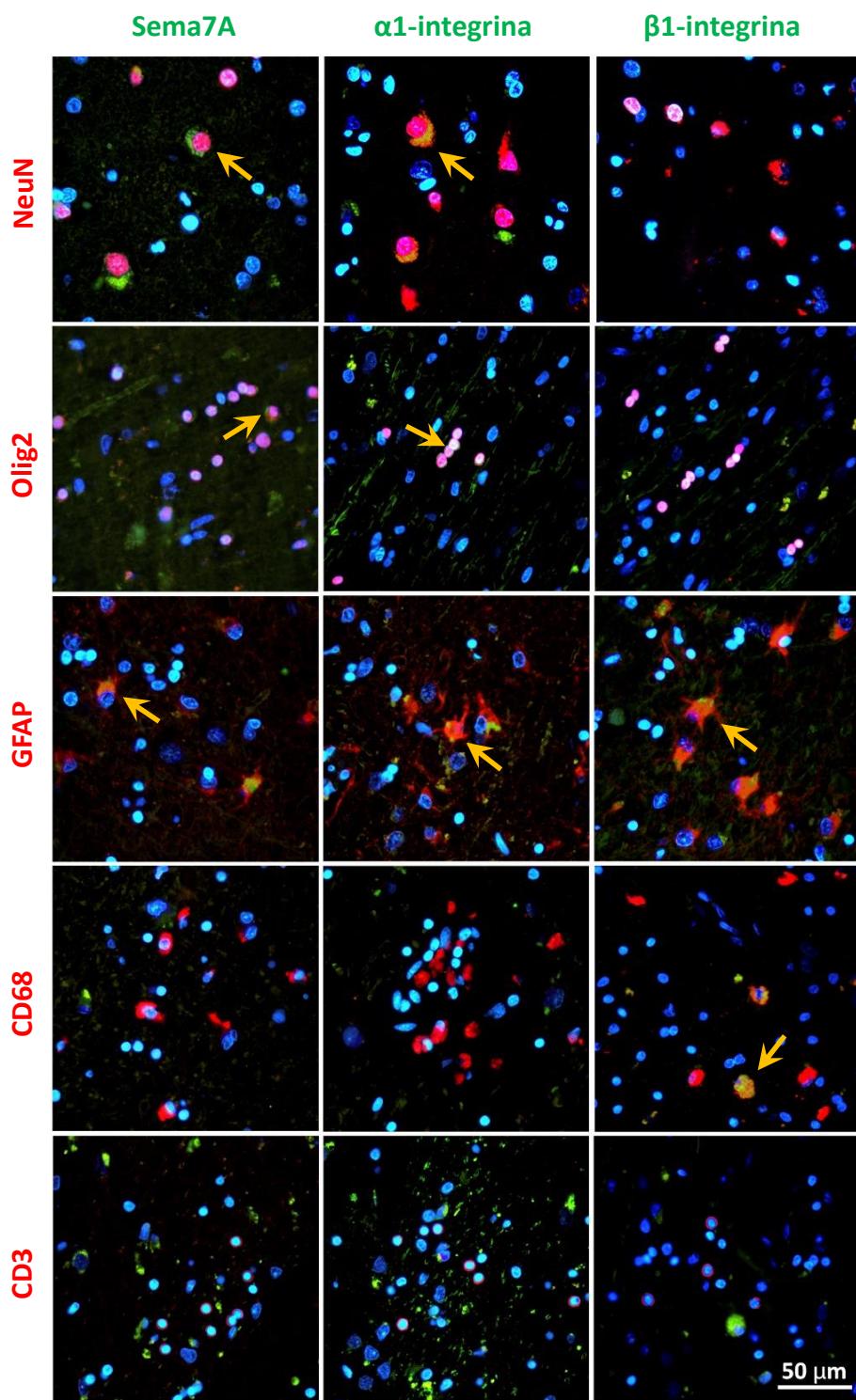


Figura 14. Expresión de la sema7A, la $\alpha 1$ -integrina y la $\beta 1$ -integrina en diferentes tipos celulares en lesiones crónicas activas de pacientes con EM. Las flechas indican las células que colocalizan para la sema7A, la $\alpha 1$ -integrina o la $\beta 1$ -integrina y los marcadores de las diferentes poblaciones celulares estudiadas: NeuN (neuronas), Olig2 (oligodendrocitos), GFAP (astrocitos), CD68 (microglía/macrófago) y CD3 (células T). Los núcleos celulares se visualizan en azul mediante tinción con DAPI.

2.1. Expresión de la sema3A y la Np-1

Con el objetivo de estudiar si la expresión de las semaforinas y sus receptores era específica de la EM, comparamos la expresión en las lesiones CAHIA de pacientes con EM con la expresión detectada en las lesiones de pacientes con AI y de pacientes con LMP así como con la observada en los pacientes NNC.

En las muestras de pacientes NNC, la sema3A se detectó en las neuronas y de forma muy tenue en algunos macrófagos perivasculares que también expresaban levemente su receptor, la Np-1 (Figura 15). Tanto en lesiones de AI como en las de LMP, la expresión de la sema3A y la Np-1 se observó en la microglía/macrófagos; además la sema3A también se expresaba ocasionalmente en las neuronas y en los astrocitos. En las lesiones CAHIA de EM, como ya se ha mencionado, se detectó la expresión de la sema3A y la Np-1 en la microglía/macrófagos y en los astrocitos reactivos. El análisis estadístico demostró que la expresión de la sema3A estaba aumentada significativamente en los astrocitos reactivos y en la microglía/macrófagos de las lesiones CAHIA respecto a las muestras de pacientes NNC, mientras que la expresión de la Np-1 estaba incrementada en la microglía/macrófagos tanto de las lesiones CAHIA de EM como de las de LMP comparado con las muestras de pacientes NNC (Figura 16). Estos resultados, sugieren que la vía de señalización de la sema3A podría ser más relevante en las lesiones de EM que en las de otras enfermedades que cursan con desmielinización.

En el estudio de la expresión de las semaforinas y sus receptores en las lesiones crónicas de EM con diferente grado de actividad inflamatoria evidenciamos un descenso en la intensidad de la expresión de la sema3A en los astrocitos reactivos y la microglía/macrófagos en las lesiones CALIA y CI respecto a las lesiones CAHIA (Figura 16), siendo las diferencias estadísticamente significativas para los astrocitos en las lesiones CI y para la microglía/macrófagos en lesiones CALIA y CI (Figura 16). En las neuronas de la SGAN adyacente a la lesión, la expresión de la sema3A era muy intensa en las lesiones CAHIA, siendo estadísticamente significativa esta diferencia con las lesiones CI de EM. El receptor de la sema3A, la Np-1, únicamente se detectó en la microglía/macrófagos y presentó un patrón

de expresión similar al de la sema3A, con una menor expresión en lesiones CALIA y CI respecto a las lesiones CAHIA (Figura 16), aunque solo resultó estadísticamente significativa cuando se compararon las lesiones CI respecto a lesiones CAHIA (Figura 16). Estos hallazgos, indicarían que el nivel de expresión de la sema3A y de la Np-1 aumenta a medida que incrementa la actividad inflamatoria de las lesiones de EM.

2.2. Expresión de la sema7A, la $\alpha 1$ -integrina y la $\beta 1$ -integrina

En el caso de la expresión de la sema7A y sus receptores, se observó que en muestras de pacientes NNC, la sema7A y la $\alpha 1$ -integrina se expresaban principalmente en los oligodendrocitos y ocasionalmente en las neuronas, mientras que la $\beta 1$ -integrina solo se detectó en algunas neuronas. En lesiones de AI y de LMP, la sema7A y sus receptores se detectaron en los astrocitos reactivos y en algunas neuronas y oligodendrocitos, mientras que la sema7A y la $\beta 1$ -integrina también pudieron observarse en la microglía/macrófagos (Figura 17). El análisis estadístico mostró un aumento significativo de la expresión de la sema7A en los astrocitos reactivos de las lesiones CAHIA y de LMP comparado con la expresión observada en las muestras de pacientes NNC, mientras que la expresión de la $\alpha 1$ -integrina y la $\beta 1$ -integrina solo estaba aumentada significativamente en astrocitos reactivos de lesiones CAHIA comparado con las muestras de pacientes NNC. Sin embargo, la expresión de la sema7A y de la $\alpha 1$ -integrina en oligodendrocitos en lesiones CAHIA estaba significativamente disminuida respecto a las muestras NNC (Figura 18). Todos estos resultados sugieren que, como en el caso de la sema3A, parece que la vía de señalización mediada por la sema7A y sus receptores podría ser más relevante en la patogenia de la EM que en la de otras enfermedades desmielinizantes.

En las lesiones CAHIA de EM la expresión de la sema7A, la $\alpha 1$ -integrina y la $\beta 1$ -integrina estaba aumentada en los astrocitos reactivos, observándose menor expresión en las lesiones de EM CALIA y CI. También confirmamos la expresión de la $\beta 1$ -integrina en la microglía/macrófagos, observándose el mismo patrón que en los astrocitos. El análisis estadístico únicamente confirmó el descenso de la expresión de la sema7A y la $\alpha 1$ -integrina en los astrocitos reactivos de las lesiones

CI respecto a las lesiones CAHIA de EM (Figura 18), lo que sugeriría que el aumento de la sema7A está asociado a la actividad infamatoria de la lesión, tal y como habíamos observado con la sema3A.

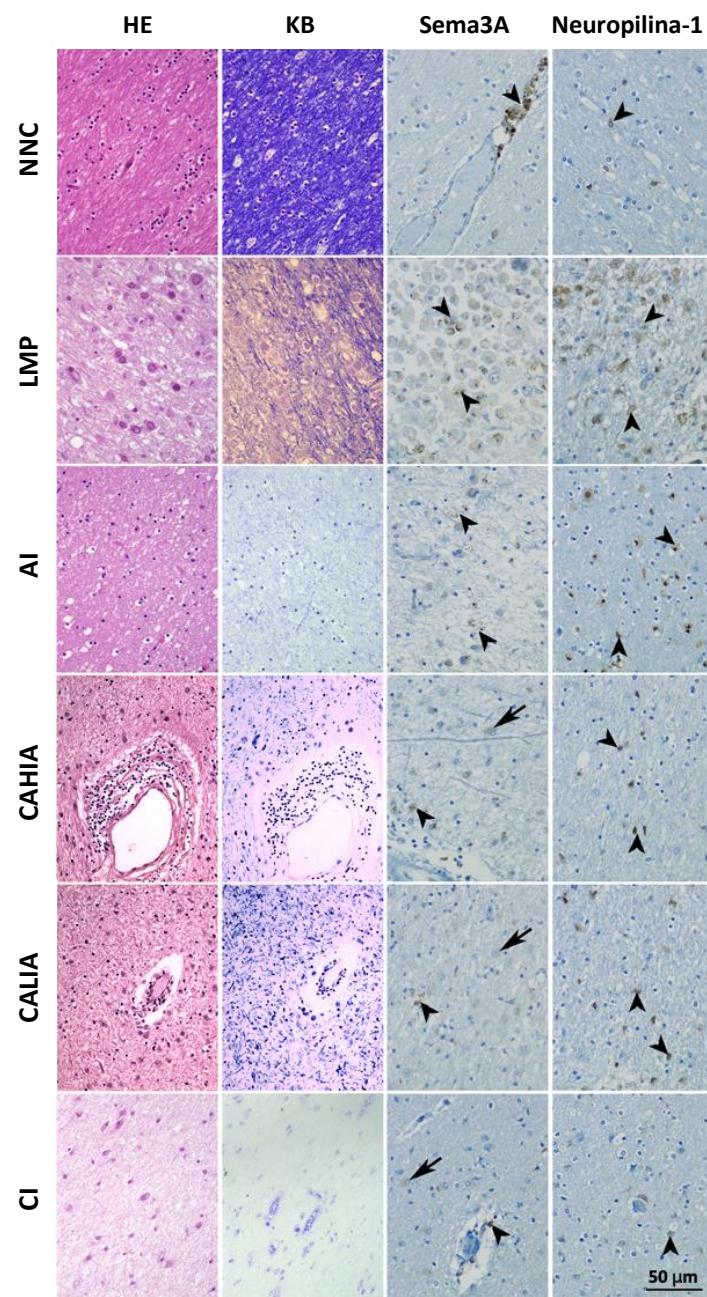


Figura 15. Histopatología de las lesiones y estudio inmunohistoquímico de la expresión de la sema3A y la Np-1 en lesiones CAHIA, CALIA y CI de pacientes con EM y en controles AI, LMP y NNC. Se realizó tinción de HE para observar la actividad inflamatoria de las lesiones y tinción de KB para determinar el grado de desmielinización. La expresión de la sema3A y la Np-1 está indicada (VV) para astrocitos y (VV) para microglía/macrófagos.

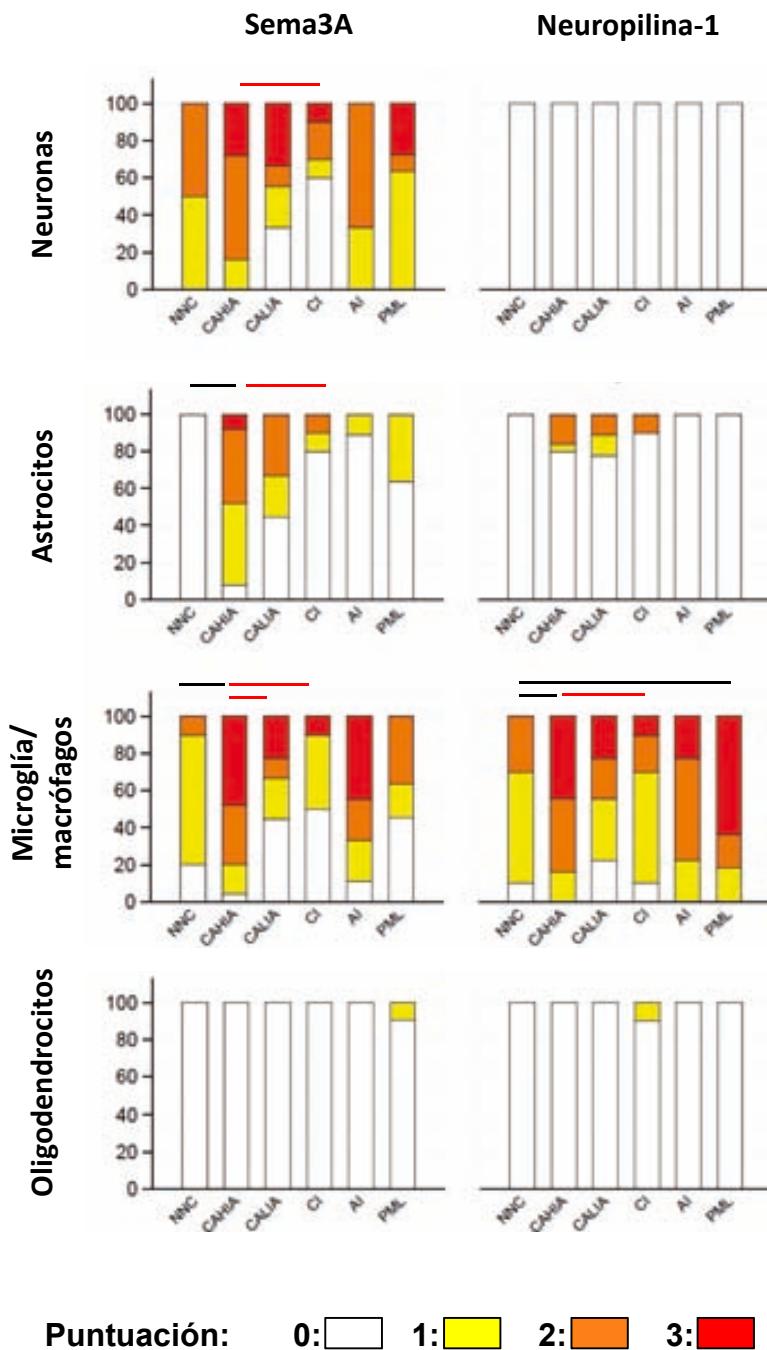


Figura 16. Valoración semi-cuantitativa de la expresión de la sema3A y la Np-1 en pacientes sin enfermedad neurológica (NNC, control), en otras enfermedades neurológicas que cursan con desmielinización (AI y LMP) y en lesiones de EM CAHIA, CALIA y CI. Cada gráfica muestra la expresión de una de las proteínas en estudio en un tipo celular específico. Las barras representan el porcentaje de lesiones que se evaluaron con una puntuación de 0, 1, 2 o 3 en cada tipo de lesión según la intensidad del marcaje. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) están indicadas con una línea negra cuando CAHIA, LMP y AI se compararon con los controles NNC y en rojo cuando CALIA y CI se compararon con CAHIA.

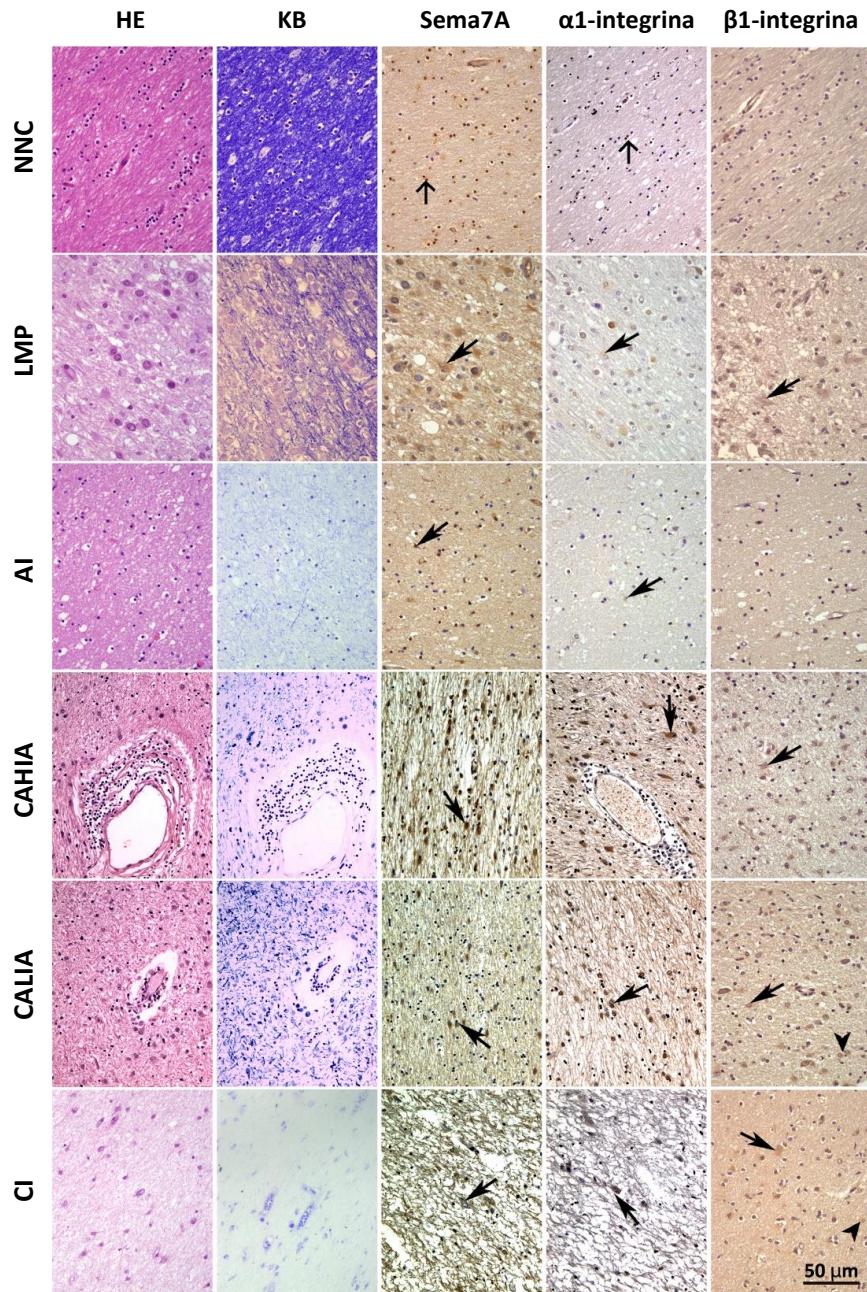


Figura 17. Histopatología de las lesiones y estudio inmunohistoquímico de la expresión de la sema7A, la $\alpha 1$ -integrina y la $\beta 1$ -integrina en lesiones CAHIA, CALIA y CI de pacientes con EM y en controles AI, LMP y NNC. Se realizó tinción de HE para observar la actividad inflamatoria de las lesiones y tinción de KB para determinar el grado de desmielinización. La expresión de la sema3A, la sema7A, y sus receptores está indicada (W) para astrocitos, (Y) para microglía/macrófagos y (V) para oligodendroctos.

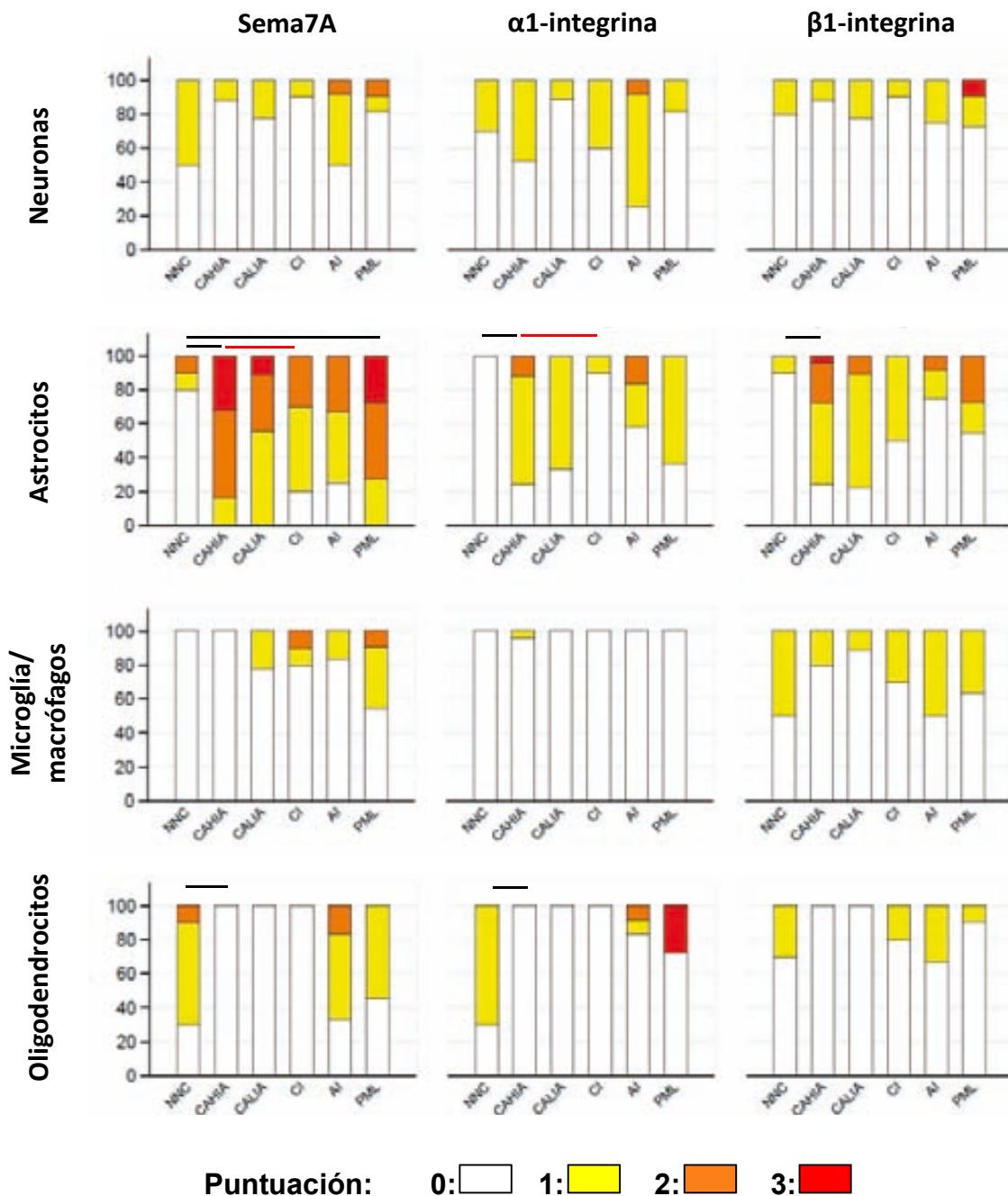


Figura 18. Valoración semi-cuantitativa de la expresión de la sema7A y sus receptores en pacientes sin enfermedad neurológica (NNC, control), en otras enfermedades neurológicas que cursan con desmielinización (AI y LMP) y en lesiones de EM CAHIA, CALIA y CI. Cada gráfica muestra la expresión de una de las proteínas en estudio en un tipo celular específico. Las barras representan el porcentaje de lesiones que se evaluaron con una puntuación de 0, 1, 2 o 3 en cada tipo de lesión según la intensidad del marcaje. Las diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) están indicadas con una línea negra cuando CAHIA, LMP y AI se compararon con los controles NNC y en rojo cuando CALIA y CI se compararon con CAHIA.

RESULTADOS

Capítulo 2. Caracterización de la sema3A, la sema7A y de sus receptores en la EAE

1. Curso clínico e histopatología de la EAE

Para estudiar el patrón de expresión de la sema3A, la sema7A y el de sus receptores durante el curso clínico de la EAE tanto en el sistema inmune como en el SNC, se indujo la enfermedad a un grupo de ratones C57BL/6 con MOG₃₅₋₅₅, a los que se les realizó seguimiento clínico durante 29 días. En diferentes momentos del curso clínico de la EAE (basal, fase de inducción, inflamatoria y crónica) se eutanasieron cinco animales. El 100% de los ratones desarrollaron signos clínicos sin mortalidad asociada a la EAE. La evolución clínica presentó una mielopatía ascendente no remitente, observándose en primera instancia debilidad en la cola y avanzando hasta perder la movilidad de los miembros traseros y posteriormente de los delanteros, tal y como se ha descrito para esta cepa de ratón inmunizada con el péptido MOG₃₅₋₅₅. El inicio de la enfermedad ocurrió a día 7,5 (desviación estándar (SD): 0,87) p.i., mostrando la máxima puntuación clínica el día 14 p.i., momento en que los animales tenían una puntuación clínica de 4,4 (0,23). Para estudiar el patrón de la expresión de la sema3A, la sema7A y de sus receptores, los animales se eutanasieron antes de inducir la enfermedad, es decir, a tiempo basal (día 0 p.i.), en la fase de inducción de la enfermedad (día 7 p.i.), en la fase inflamatoria (día 16 p.i.) y en el inicio de la fase crónica (día 29 p.i.) (Figura 19).

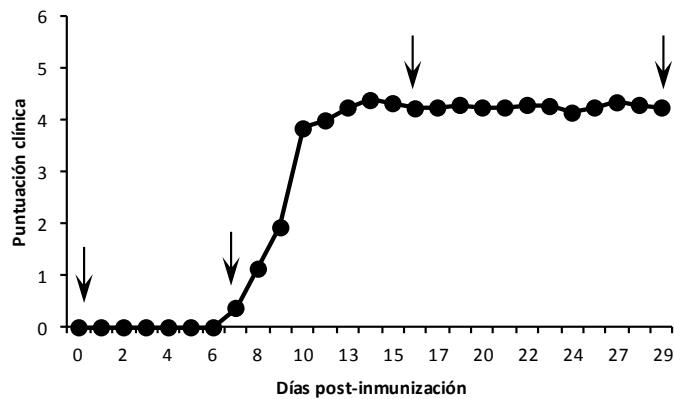


Figura 19. Curso clínico de la EAE y momentos del curso clínico a los que se estudió la expresión de la sema3A, la sema7A y la de sus receptores. (↓) indica el día en que se eutanasieron cinco ratones para realizar el estudio de la expresión de las semaforinas y sus receptores: día 0, basal; día 7, fase de inducción; día 16, fase inflamatoria; y día 29, fase crónica de la EAE.

El estudio histopatológico reveló que en el momento basal no había signos de inflamación ni desmielinización en el encéfalo o en la médula espinal de los

animales. Durante la fase de inducción, los ratones mostraron una infiltración inflamatoria discreta compuesta por linfocitos y células polimorfonucleares en el espacio subaracnoideo del encéfalo así como en la médula espinal. En la fase inflamatoria, observamos abundantes células infiltrantes compuestas por linfocitos y macrófagos, y también regiones con un grado de desmielinización moderado en la sustancia blanca de la médula espinal. Finalmente, en la fase crónica se observaron características similares a la fase inflamatoria siendo el grado de desmielinización más severo además de detectarse cámaras de digestión que consistían en fragmentos globulares que representan las vainas de mielina en degeneración (Figura 20).

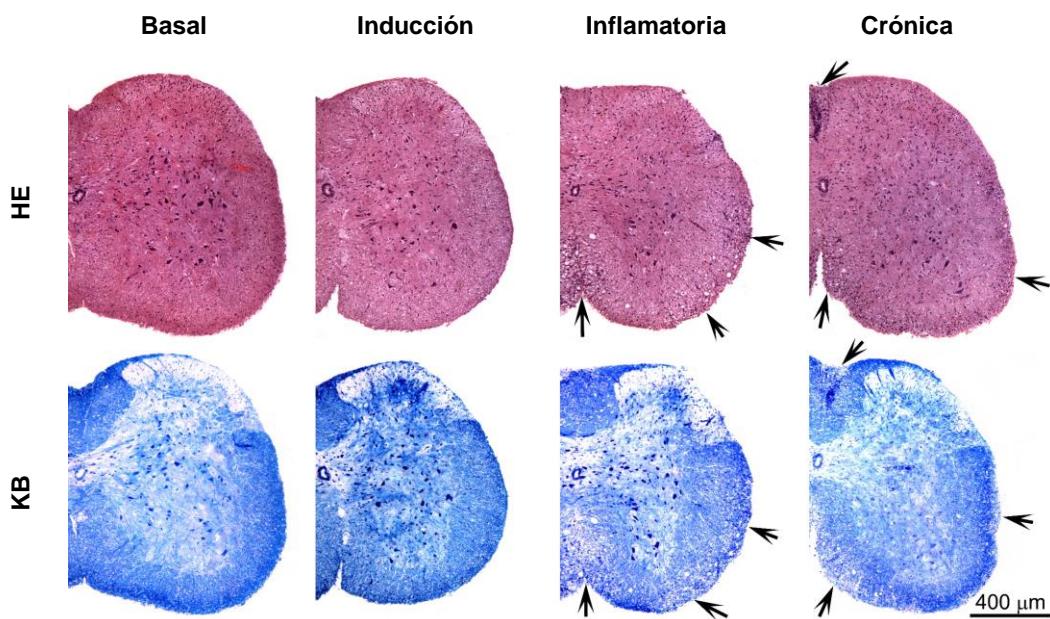


Figura 20. Histopatología de la médula espinal de ratones con EAE en los diferentes momentos de estudio. El grado de infiltración celular se observó mediante la tinción de HE mientras que la desmielinización se detectó con la tinción de KB. Las flechas indican en cada caso áreas de infiltración celular y desmielinización.

2. *Perfil de expresión de la sema3A, la sema7A y de sus receptores en el SNC durante la EAE*

2.1. **La sema3A, la sema7A y sus receptores se expresan en diferentes tipos celulares del SNC**

Mediante inmunolectinaciones dobles con fluorescencia, evaluamos la expresión de la sema3A, la Np-1, la sema7A, la $\alpha 1$ -integrina y la $\beta 1$ -integrina en diferentes tipos celulares del SNC y células infiltrantes en la médula espinal, en la fase

inflamatoria de la EAE (día 16 p.i.). No conseguimos las condiciones adecuadas para la colocalización de la expresión del receptor de la sema3A, la PLXN-A1, ni para el receptor de la sema7A, la PLXN-C1 con los marcadores de las diferentes poblaciones celulares estudiadas.

Se detectó la expresión de la sema3A y la Np-1 en algunas neuronas. Además la sema3A también se observó en los astrocitos reactivos. En el área de la lesión, ambas proteínas se localizaron en la microglía/macrófagos, aunque solo la Np-1 se expresó en células T y B infiltrantes (Figura 21).

La sema7A, la α 1-integrina y la β 1-integrina se observaron en las neuronas y en los astrocitos reactivos, aunque solo la sema7A y la α 1-integrina se detectaron en los oligodendrocitos. En los infiltrados inflamatorios, la sema7A y sus receptores se expresaron en los linfocitos T y B. La β 1-integrina también se observó en la microglía/macrófagos (Figura 22).

2.2. Cambios en la expresión de la sema3A, la sema7A y de sus receptores durante la evolución clínica de la EAE

El análisis cuantitativo de la expresión de la sema3A, la sema7A y el de sus receptores la realizamos en la médula espinal de los animales en las diferentes fases de la enfermedad ya descritas (Figura 23). Estudiamos el infiltrado inflamatorio y la sustancia blanca perilesional (Figura 9).

2.2.1. Sema3A y sus receptores

En el estado basal, en animales sin inmunizar, detectamos expresión de la sema3A en las neuronas y en algunas células gliales; la Np-1 se observó discretamente en algunas neuronas y la PLXN-A1 se observó principalmente en células endoteliales y en algunas células gliales de la sustancia blanca (Figura 21,23).

En la sustancia blanca perilesional, la expresión de la sema3A incrementó en la fase de inducción ($p=0,0012$), mientras que en la fase inflamatoria, estaba aumentada la expresión tanto de la sema3A como la de sus receptores (sema3A: $p=0,0002$; Np-1: $p<0,0001$; PLXN-A1: $p=0,0021$). En la fase crónica, solo los receptores de la sema3A se mantuvieron elevados al compararlo con los niveles basales (Np-1: $p=0,0007$; PLXN-A1: $p=0,0003$) (Figura 24ab).

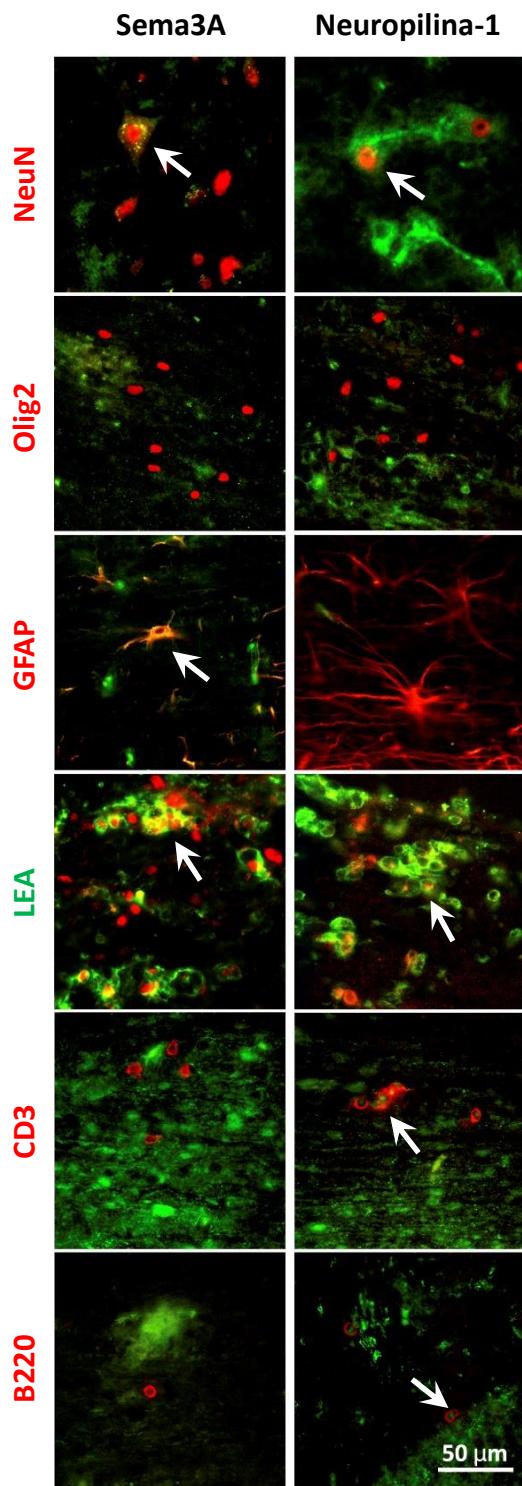


Figura 21. Expresión de la sema3A y la Np-1 en diferentes poblaciones celulares de la médula espinal durante la fase inflamatoria de la EAE. La sema3A y la Np-1 se marcaron en verde excepto para la colocalización con la microglía, en donde el marcaje fue en rojo. Neuronas (NeuN), oligodendrocitos (Olig2), astrocitos (GFAP), microglía/macrófagos (LEA), células T (CD3), células B (B220).

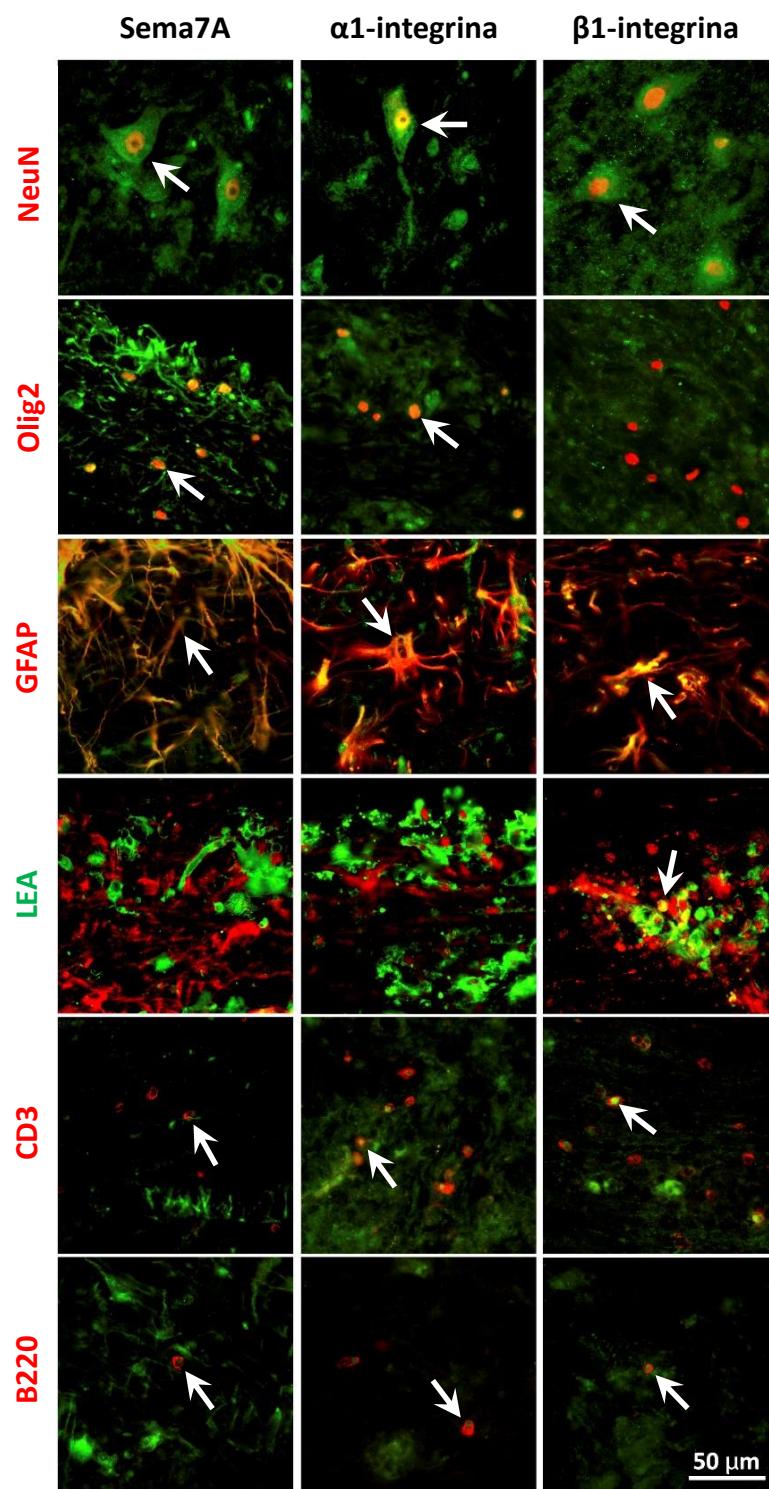


Figura 22. Expresión de la sema7A y sus receptores en diferentes poblaciones celulares de la médula espinal durante la fase inflamatoria de la EAE. La sema7A, la $\alpha 1$ -integrina y la $\beta 1$ -integrina se visualizaron en verde excepto para la co-localización con la microglía, donde el marcaje fue en rojo. Neuronas (NeuN), oligodendrocitos (Olig2), astrocitos (GFAP), microglía/macrófagos (ILEA), células T (CD3), células B (B220).

En el infiltrado inflamatorio los niveles de expresión los comparamos con los valores obtenidos durante la fase de inducción, ya que a tiempo basal no había lesión. La expresión de la Np-1 aumentó durante la fase inflamatoria ($p=0,0363$), mientras que en la fase crónica disminuyó ($p=0,0153$). La expresión de la sema3A y de la PLXN-A1 aumentó significativamente durante la fase crónica de la EAE (sema3A: $p=0,0010$; PLXN-A1: $p=0,0374$) (Figura 24a,c).

2.2.2. Sema7A y sus receptores

En estado basal, la sema7A y la $\alpha 1$ -integrina se detectaron en las neuronas y en un gran número de células gliales, mientras que la $\beta 1$ -integrina se expresó en algunas neuronas y ambas integrinas se observaron también por todo el neurópilo (Figura 22,23).

En la sustancia blanca perilesional, durante la fase de inducción la expresión de la $\alpha 1$ -integrina estuvo aumentada ($p=0,0003$), mientras que durante la fase inflamatoria, aumentó la expresión tanto de la sema7A ($p<0,0001$) como de la $\alpha 1$ -integrina ($p<0,0001$). En la fase crónica, la expresión de ambas integrinas estaba incrementada ($\alpha 1$ -integrina: $p<0,0001$; $\beta 1$ -integrina: $p=0,0199$) (Figura 24a,b).

En el infiltrado inflamatorio, la sema7A y sus receptores mostraron un aumento de su expresión durante la fase inflamatoria (sema7A: $p=0,0016$; $\alpha 1$ -integrina: $p=0,0097$; $\beta 1$ -integrina: $p<0,0001$), que se mantuvo durante la fase crónica excepto en el caso de la $\alpha 1$ -integrina (sema7A: $p=0,0487$; $\beta 1$ -integrina: $p<0,0001$) (Figura 24a,c).

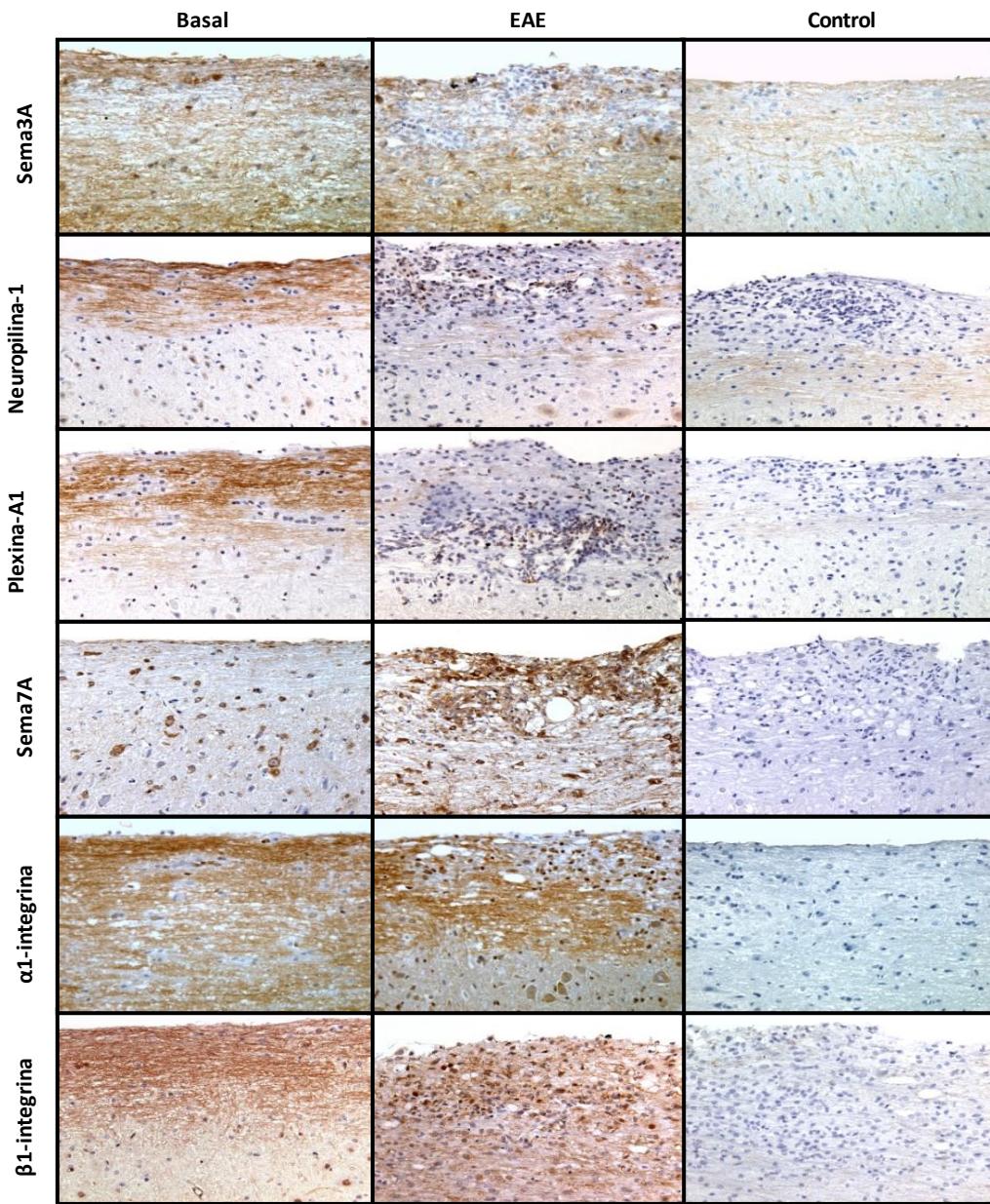


Figura 23. Ejemplo representativo del inmunomarcaje para la sema3A, la sema7A y sus receptores en la médula espinal de ratones en el momento basal (Basal) y en la fase crónica de la EAE (EAE). Se realizó un control negativo (Control) de la tinción que se procesó de igual manera pero en ausencia del anticuerpo primario que no presentó ningún tipo de marcaje específico. Panel realizado a 20X.

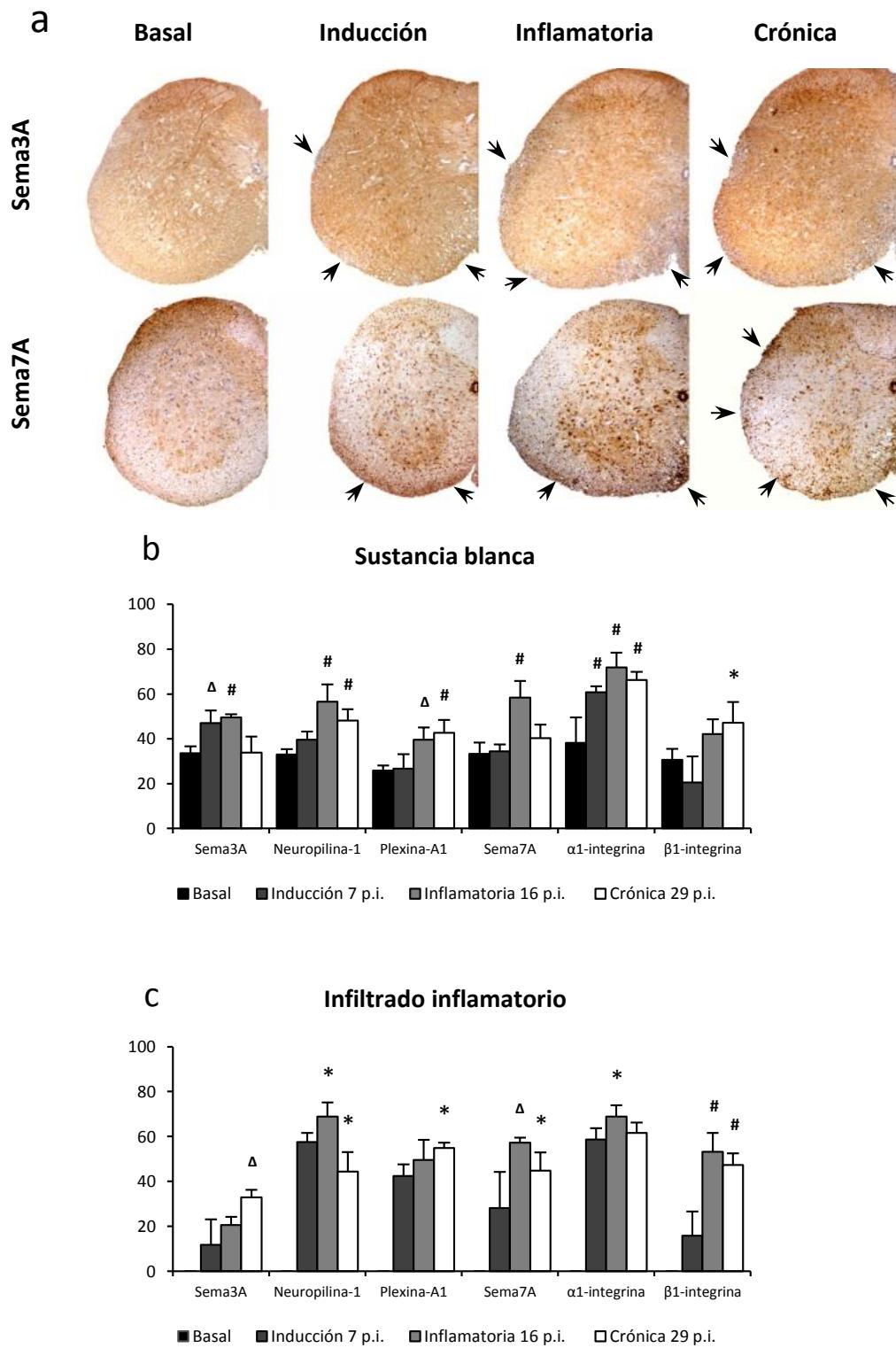


Figura 24. Inmunohistoquímica para la sema3A y la sema7A en la médula espinal de ratones con EAE en los diferentes momentos de estudio. Panel realizado a 5X (a). Las flechas indican las áreas con infiltración de células inflamatorias. Porcentaje de células positivas que expresan la sema3A, la sema7A y sus receptores en la sustancia blanca perilesional ($n=5$ /fase) (b) y en el infiltrado inflamatorio ($n=5$ /fase) (c) en las diferentes fases de la EAE. Las barras de error representan la SD. El análisis estadístico se realizó comparando los valores obtenidos en cada fase con los niveles de expresión basal en la sustancia blanca perilesional y respecto los valores de la fase de inducción en el infiltrado inflamatorio. $*p<0,05$; $^{\Delta}p<0,005$; $^{\#}p<0,0005$.

3. La sema3A y la sema7A muestran distintos patrones de expresión después de la inducción de la EAE en las diferentes subpoblaciones celulares del sistema inmune

Tras caracterizar la expresión de la sema3A, la sema7A y sus receptores en células del SNC de ratones con EAE, estudiamos los cambios de expresión en diferentes poblaciones celulares del sistema inmune relevantes en la patogenia de la EAE/EM.

3.1. Expresión de la sema3A y sus receptores en el desarrollo de la EAE en las células del sistema inmune

La expresión de la sema3A y la PLXN-A1 se analizó mediante western blot y la expresión de la Np-1 por citometría de flujo.

El anticuerpo anti-sema3A detectó tres bandas específicas (125, 95 y 65 kDa) en esplenocitos estimulados con PMA e ionomicina que se correspondían con la pre-sema3A, la isoforma activa y la isoforma con menor actividad respectivamente. La especificidad de la detección se confirmó mediante la pre-incubación del anticuerpo anti-sema3A con el péptido inmunogénico utilizado para su generación. La expresión de la forma activa de la sema3A (95 kDa) así como de su isoforma de menor actividad (65 kDa) mostraron una reducción de su expresión durante la fase de inducción de la enfermedad (sema3A 95 kDa: $p=0,0033$; sema3A 65 kDa: $p=0,0003$) que se mantuvo en la fase crónica (sema3A 95 kDa: $p=0,0118$; sema3A 65 kDa: $p=0,0004$) (Figura 25a). De modo similar, la expresión de la PLXN-A1 también disminuyó durante la fase de inducción y en la fase crónica de la EAE (inducción: $p=0,0442$; crónica: $p=0,0090$) (Figura 25b).

La expresión de la Np-1 en esplenocitos activados la detectamos mediante citometría de flujo, lo que permitió estudiar su expresión en diferentes poblaciones de células inmunes. Observamos una reducción significativa del porcentaje de células que expresaban la Np-1 en las poblaciones de células T CD4+ (inducción: $p<0,0001$; inflamatoria: $p=0,0002$; crónica: $p=0,0009$), células T CD8+ (inducción: $p=0,0119$; inflamatoria: $p=0,0090$; crónica: $p<0,0001$), células mieloides (inducción: $p<0,0001$; inflamatoria: $p<0,0001$; crónica: $p<0,0001$) y células dendríticas (inducción: $p=0,0105$; inflamatoria: $p=0,0019$; crónica: $p=0,0320$) durante todas las fases de la enfermedad respecto los niveles basales. El

porcentaje de linfocitos B2 que expresaron la Np-1 se redujo a partir de la inducción de la EAE aunque solo resultó estadísticamente significativo durante la fase inflamatoria ($p=0,0170$) (Figura 25c).

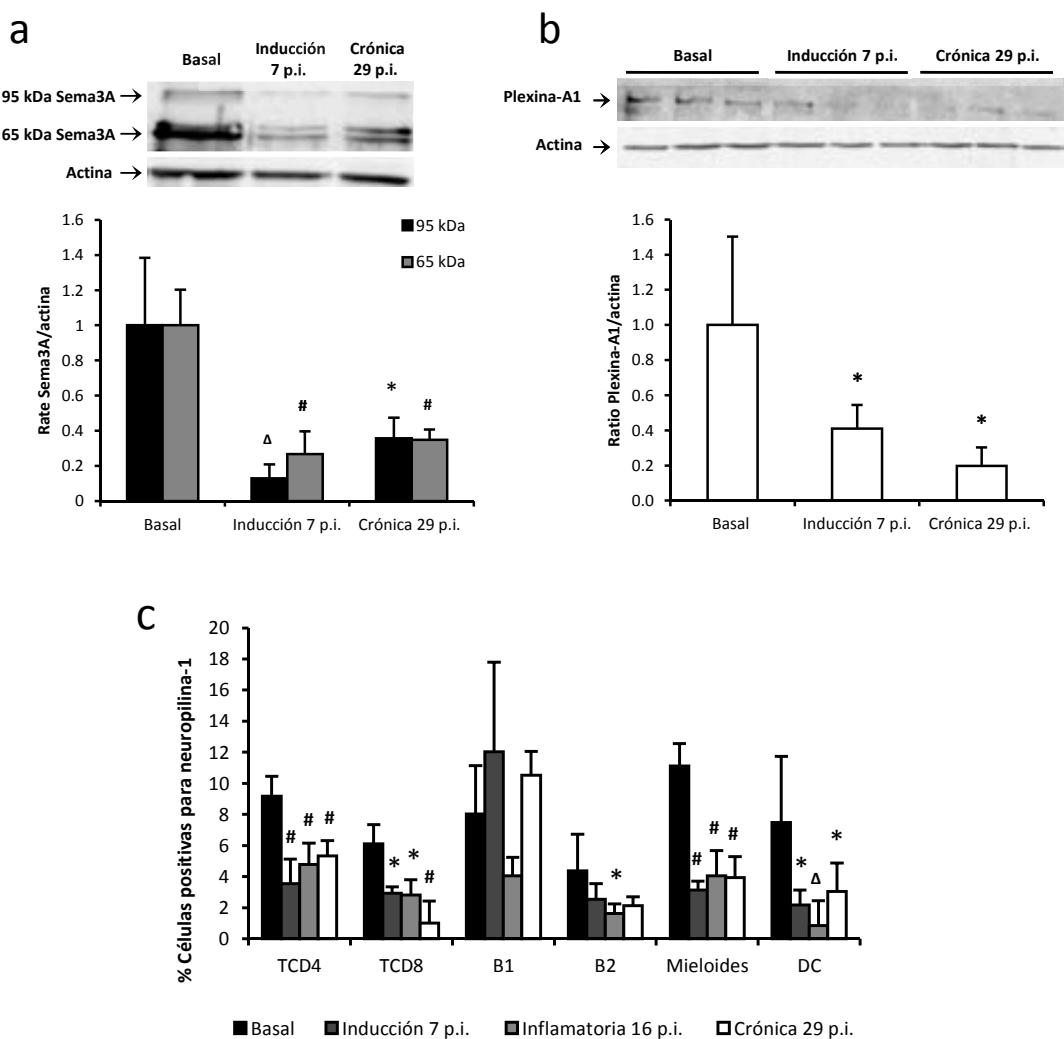


Figura 25. Expresión de la sema3A y de sus receptores en esplenocitos activados con PMA e ionomicina. Ratio normalizado respecto a la expresión de la actina de la expresión de la sema3A (a) y de la PLXN-A1 (b) mediante western blot ($n=4-5$ /fase). Porcentaje de células positivas para la Np-1 en diferentes poblaciones de células inmunes durante la EAE ($n=5$ /fase) (c). Las barras de error representan la SD. El análisis estadístico se realizó comparando los valores obtenidos en cada fase con los niveles de expresión en el momento basal. $*p<0,05$; $^{\Delta}p<0,005$; $^{\#}p<0,0005$. TCD4: Células T CD4+; TCD8: células T CD8; B1: células B T-independientes; B2: células B T-dependientes; DC: células dendríticas.

3.2. Patrón de expresión de la sema7A y de sus receptores

La expresión de la sema7A y la $\beta 1$ -integrina la estudiamos mediante citometría de flujo. Sin embargo, no conseguimos establecer las condiciones adecuadas para la detección de la $\alpha 1$ -integrina y la PLXN-C1 por citometría de flujo ni por western blot. En los linfocitos T, tanto en las células T CD4+ como en las TC8+, el porcentaje de células positivas para la sema7A aumentó durante la fase inflamatoria de la enfermedad (TCD4+: $p=0,0068$; TCD8+: $p=0,0007$). En ambas poblaciones de linfocitos T se observó una disminución estadísticamente significativa durante la fase crónica de la EAE (TCD4+: $p=0,0083$; TCD8+: $p<0,0001$). En los linfocitos B, tanto en la población de células T-independientes (B1) como en las células T-dependientes (B2), la expresión de la sema7A aumentó tras la inmunización de los animales y se mantuvo elevada durante el curso clínico de la EAE (inducción, B1: $p=0,0382$; B2 $p=0,0321$; inflamatoria, B1: $p=0,0013$; B2: $p=0,0007$; crónica, B1: $p=0,0013$; B2: $p=0,0017$). Tanto en las células mieloides como en las DC se observó un mismo patrón en el porcentaje de células positivas para la sema7A, que aumentó significativamente durante la fase de inducción ($p=0,0001$, en ambas poblaciones) pero que disminuyó considerablemente durante la fase inflamatoria (células mieloides: $p=0,0079$; DC: n.s.) y en la fase crónica (células mieloides: $p<0,0001$; DC: $p=0,0014$) (Figura 26,27a).

La expresión de la $\beta 1$ -integrina fue muy similar a la observada para la sema7A en los linfocitos B1 (T-independientes), mostrando un incremento del porcentaje de células positivas durante la fase de inducción que se mantuvo durante el curso clínico de la EAE (inducción: $p=0,0003$; inflamatoria: $p=0,0013$; crónica: $p=0,0006$). A pesar de que el porcentaje de linfocitos B2 (T-dependientes) que expresan $\beta 1$ -integrina era bajo comparado con el observado en las otras poblaciones de células inmunes estudiadas, se pudo observar un aumento del porcentaje de células B2 positivas durante la fase de inducción ($p<0,0001$) y en la fase crónica ($p=0,0466$) de la EAE. En las DC, el porcentaje de células positivas para la $\beta 1$ -integrina también aumentó durante la fase de inducción ($p<0,0001$) y la fase inflamatoria ($p=0,0001$) de la EAE, volviendo a los niveles basales en la fase crónica. En los linfocitos T CD4+, el porcentaje de células positivas disminuyó tras la inmunización de los animales (inducción: $p=0,0008$; inflamatoria: $p=0,0106$); sin

embargo, aumentó significativamente en la fase crónica de la EAE ($p=0,0386$). En los linfocitos T CD8+ solo se evidenció un aumento del porcentaje de células que expresaban la $\beta 1$ -integrina durante la fase inflamatoria de la enfermedad ($p=0,0052$) (Figura 27b).

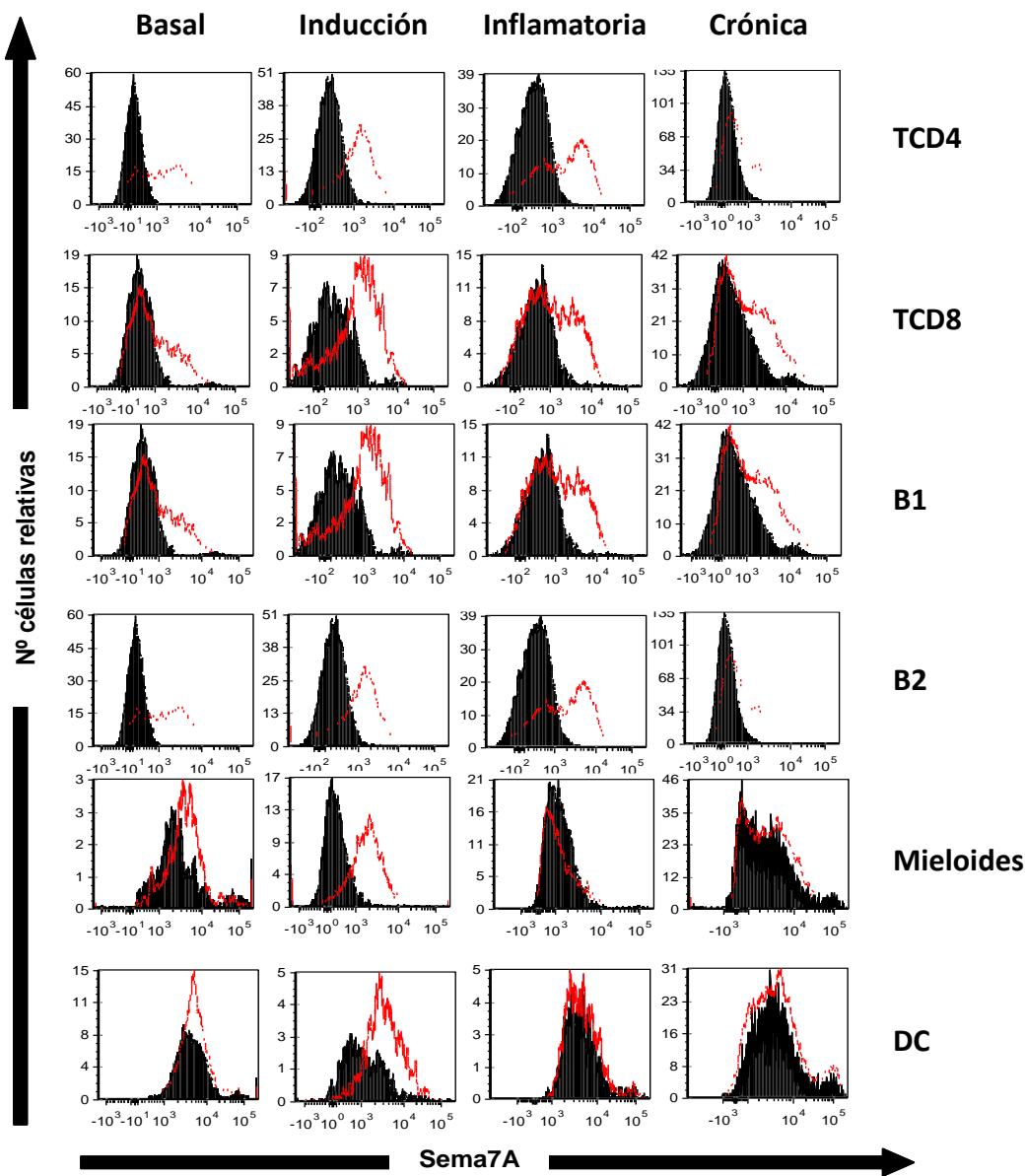


Figura 26. Histogramas de un análisis representativo del estudio por citometría de flujo de la sema7A en diferentes subpoblaciones celulares durante el curso clínico de la EAE. La línea roja corresponde al marcaje para la sema7A y el área negra a su isotipo control. Se representan los valores obtenidos para un animal. TCD4: Células T CD4+; TCD8: células T CD8+; B1: células B T-independientes; B2: células B T-dependientes, DC: células dendríticas.

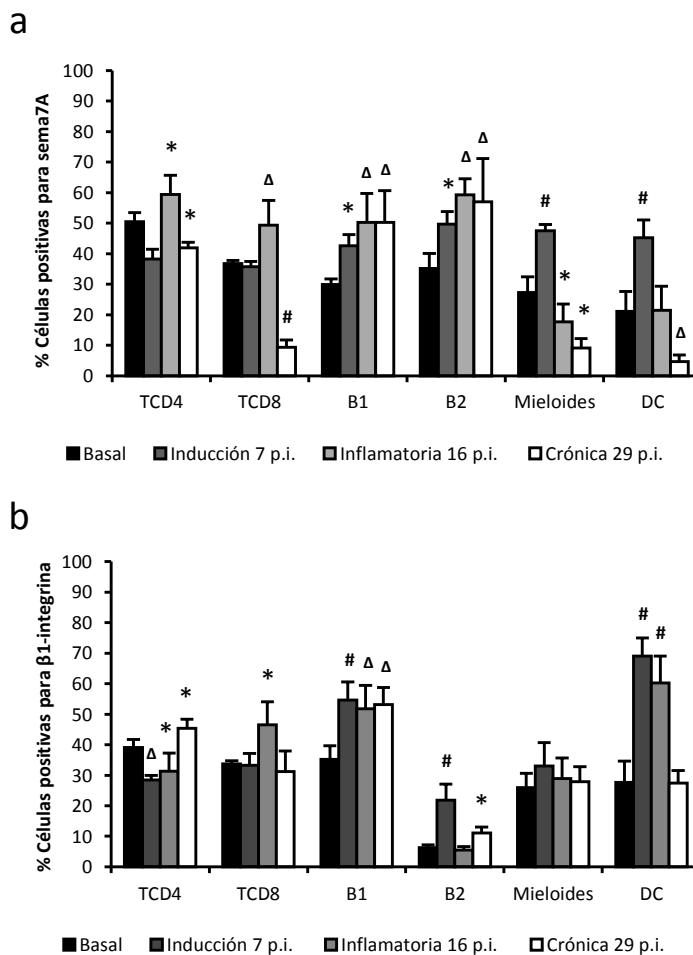


Figura 27. Porcentaje de células positivas para la sema7A (a) y la $\beta 1$ -integrina (b) en diferentes poblaciones de células inmunes durante el curso clínico de la EAE ($n=5$ /fase). Las barras de error representan la SD. El análisis estadístico se realizó comparando los valores obtenidos en cada fase con los niveles de expresión en el momento basal. $*p<0,05$; $^{\wedge}p<0,005$; $#p<0,0005$. TCD4: células T CD4+; TCD8: células T CD8+; B1: células B T-independientes; B2: células B T-dependientes; DC: células dendríticas.

3.3. Expresión génica de la sema3A y la sema7A durante la EAE

Para caracterizar el perfil de la expresión génica de la sema3A y de la sema7A durante la EAE, estimulamos los esplenocitos de los ratones con PMA e ionomicina y cuantificamos los niveles de ARNm mediante qPCR. Detectamos niveles muy bajos de la expresión génica de la sema3A en todas las fases de estudio. Sin embargo, la expresión génica de la sema7A aumentó más de 20 veces a partir de la fase de inducción de la EAE y se mantuvo elevada durante todo el curso clínico de la enfermedad (inducción: $p<0,0001$; inflamatoria: $p<0,0001$; crónica: $p<0,0001$) (Figura 28).

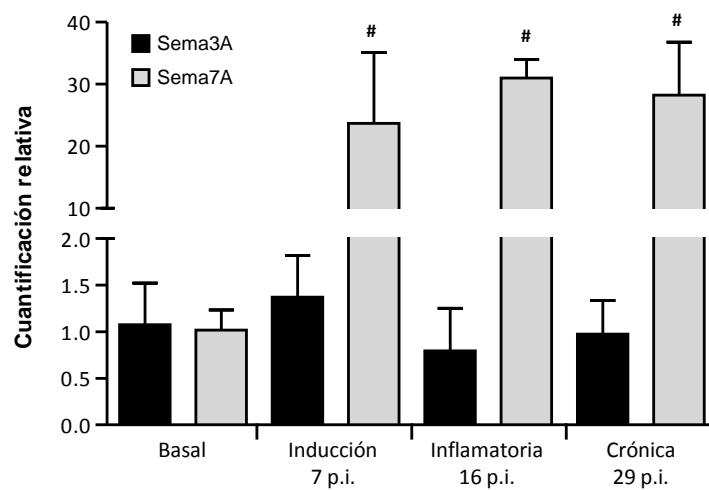


Figura 28. Niveles de expresión relativa de ARNm para la sema3A y la sema7A en esplenocitos estimulados con PMA e ionomicina en las diferentes fases de la EAE (n=3–5/fase). Las barras de error representan la SD. El análisis estadístico se realizó comparando los valores obtenidos en cada fase con los niveles de expresión en el momento basal. * $p<0,0005$.

RESULTADOS



Capítulo 3. Función de la sema7A en la EAE

1. Establecimiento de la colonia de ratones sema7AKO

La colonia de ratones sema7AKO y ratones WT se estableció en el estabulario de nuestro centro a partir de animales cedidos por el Dr. A. Kolodkin (Pasterkamp *et al.*, 2003), del departamento de Neurociencias de la *The Johns Hopkins University School of Medicine* en Baltimore, USA.

1.1. Animales fundadores y genotipado

Tras establecer la colonia de ratones sema7AKO y WT en las instalaciones SPF de nuestro estabulario, llevamos a cabo un control genético rutinario como control de calidad del mantenimiento de la colonia y además analizamos el genotipo de todos los animales incluidos en esta tesis doctoral (Figura 29).

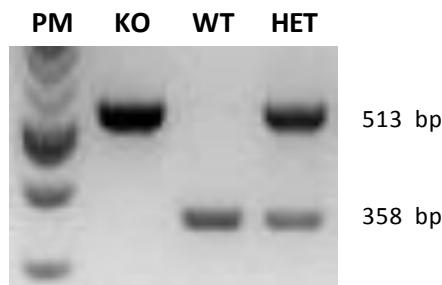


Figura 29. Genotipado de un animal deficiente en la expresión de la sema7A (KO), un animal control (WT) y un animal heterocigoto (HET). Las bandas corresponden a 513 bp para el alelo del gen mutado y de 358 bp para el gen natural.

A partir del protocolo de genotipado que nos facilitó el Dr. A. Kolodkin, optimizamos las condiciones de amplificación por PCR calculando la temperatura de fusión de los cebadores y aumentando la temperatura de hibridación consiguiendo eliminar bandas inespecíficas que podían confundir el resultado del genotipado.

2. Curso clínico de la EAE en ratones sema7AKO

2.1. Los ratones sema7AKO no muestran diferencias en el curso clínico de la EAE respecto a los ratones control con el protocolo estándar establecido en nuestro laboratorio

Con el objetivo de estudiar la función de la sema7A en el desarrollo y en el curso clínico de la EAE, inmunizamos ratones sema7AKO (n=18) y WT (n=21) con las condiciones establecidas actualmente en nuestro laboratorio (Dosis Lab): 50 µg de péptido MOG₃₅₋₅₅, 300 µg de McT y dos dosis de 150 ng de Tp por ratón. Ambos grupos presentaron un curso clínico crónico prácticamente idéntico (Figura 30),

con una incidencia del 100% y sin presentar diferencias significativas en la tasa de mortalidad, el día de inicio, la puntuación acumulada o la puntuación máxima (Tabla 8). Uno de los animales WT se excluyó del experimento debido a que sufrió un síndrome urémico por distonía vesical generado por la parálisis posterior que desarrolló y que podía desembocar en muerte por una complicación infecciosa, por lo que el animal fue eutanasiado para evitar el sufrimiento del animal. Este ratón fue incidente y desarrolló un curso clínico crónico como el resto de los ratones aunque como no cumplió el periodo de seguimiento del estudio (eutanasiado a día 21 p.i.) no se incluyó en el análisis estadístico de los resultados.

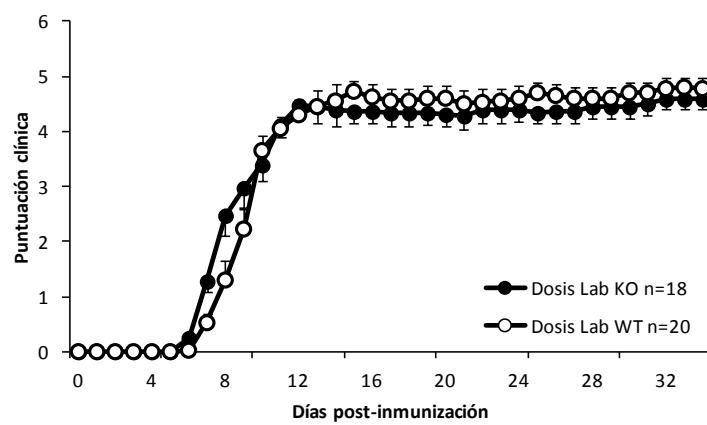


Figura 30. Seguimiento clínico de los ratones sema7AKO (KO) y WT inmunizados con la Dosis Lab. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

2.2. Relevancia de la dosis de péptido encefalitogénico y de adyuvante en el curso clínico

Inmunizamos ratones con 1, 10, 50 y 100 µg de péptido MOG₃₅₋₅₅, 100 µg de McT y dos dosis de 100 ng de Tp por ratón. Al inmunizar con dosis muy bajas de péptido encefalitogénico (1 µg), los animales no presentaron ningún signo clínico de la enfermedad (sema7AKO n=6; WT n=7), mientras que con 10 µg (sema7AKO n=19; WT n=20) la incidencia aumentó hasta el 79% en los ratones sema7AKO y al 100% en los ratones WT ($p=0,047$) (Figura 31, Tabla 8), observándose, además, que en algunos ratones incidentes el grado de gravedad de la EAE era equiparable a los ratones inmunizados con la Dosis Lab, es decir, que podían alcanzar puntuaciones clínicas de 4 ó 4,5. Los ratones inmunizados con las dosis de 50 µg de MOG₃₅₋₅₅, 100 µg de McT y 100 ng de Tp (sema7AKO n=13; WT n=12) presentaron una incidencia del 100% con diferencias significativas entre ambos genotipos en la

puntuación clínica acumulada ($p=0,029$) siendo inferior en los ratones sema7AKO. No se observaron diferencias significativas en la tasa de mortalidad ni en el resto de variables clínicas analizadas (Figura 31, Tabla 8). Los ratones sema7AKO ($n=11$) y WT ($n=11$) inmunizados con 100 μ g de péptido encefalitogénico presentaron un curso clínico muy similar (Figura 31), sin encontrar diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables clínicas estudiadas (Tabla 8). Tres animales sema7AKO inmunizados con la dosis de 100 μ g se tuvieron que excluir del experimento y del análisis al ser eutanasiados antes de finalizar el periodo de seguimiento tras sufrir un síndrome urémico por distonía vesical originado por la parálisis trasera que podía conllevar a una infección generalizada (eutanasiados a día 27 y 32 p.i.), sin que se observaran diferencias en el curso clínico ni en la gravedad de la EAE de estos animales respecto al resto del grupo.

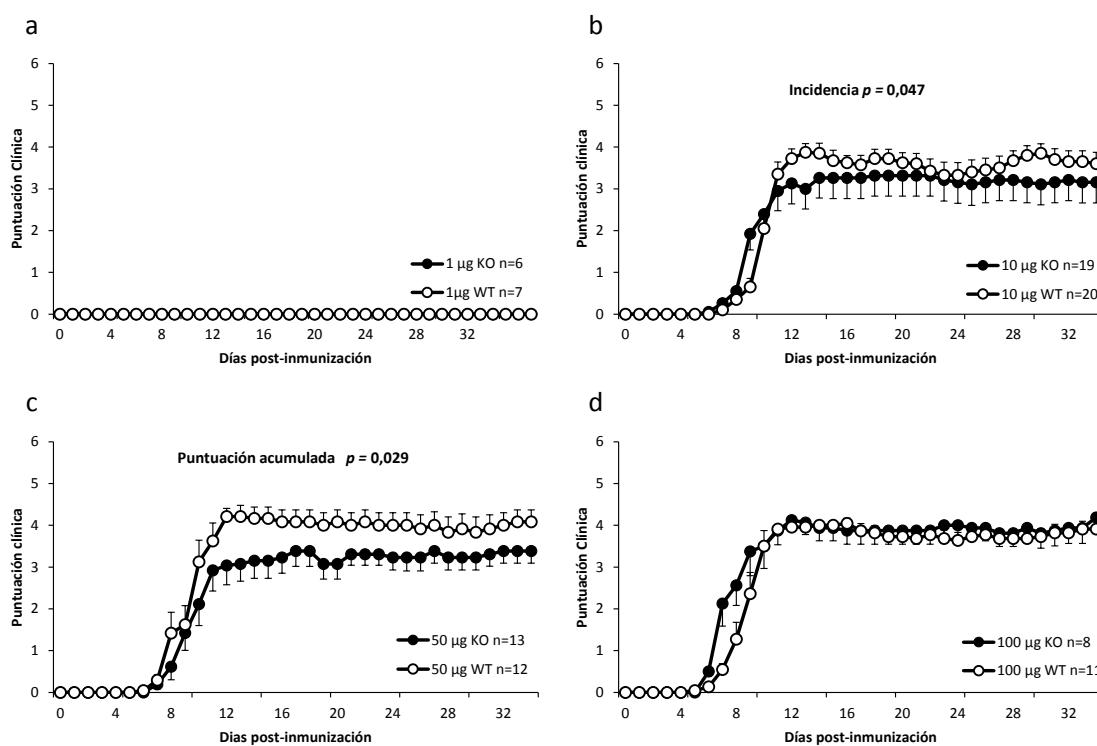


Figura 31. Seguimiento clínico de los ratones sema7AKO (KO) y WT inmunizados con diferentes dosis de péptido MOG₃₅₋₅₅: 1 μ g (a), 10 μ g (b), 50 μ g (c) y 100 μ g (d) con 100 μ g de McT y 100 ng de Tp. Las barras de error representan la SEM.

Tabla 8. Variables clínicas de los ratones sema7AKO (KO) y WT inmunizados con diferentes dosis de antígeno y de adyuvantes.

Dosis	Grupo (N)	% Incidencia	% Mortalidad	Día de inicio (SD)	Puntuación acumulada (SD)	Puntuación máxima (SD)
Dosis Lab	KO (18)	100 (18/18)	22 (4/18)	7,89 (1,78)	115,89 (20,42)	4,69 (0,75)
	WT (20)	100 (20/20)	29 (6/21)	8,50 (1,99)	117,80 (25,05)	4,88 (0,78)
1 µg	<i>p</i>	ns	ns	ns	ns	ns
	KO (6)	0	0	0	0	0
10 µg	WT (7)	0	0	0	0	0
	<i>p</i>	ns	ns	ns	ns	ns
KO (19)	79 (15/19)	26 (5/19)	8,33 (1,99)	81,89 (53,68)	3,61 (2,15)	
	WT (20)	100 (20/20)	10 (2/20)	9,40 (2,09)	89,85 (23,15)	4,30 (0,62)
50 µg	<i>p</i>	0,047	ns	ns	ns	ns
	KO (13)	100 (13/13)	8 (1/13)	10,00 (3,81)	82,00 (26,30)	4,19 (0,56)
WT (12)	100 (12/12)	17 (2/12)	8,50 (1,20)	102,88 (25,0)	4,50 (0,74)	
	<i>p</i>	ns	ns	ns	0,029	ns
KO (8)	100 (8/8)	13 (1/8)	6,75 (1,75)	106,31 (29,46)	4,44 (0,68)	
	WT (11)	100 (11/11)	0	7,73 (1,79)	99,36 (13,76)	4,18 (0,46)
100 µg	<i>p</i>	ns	ns	ns	ns	ns

ns: no significativo.

2.2.1. El curso clínico en ratones sema7AKO depende de la dosis de péptido encefalitogénico empleada

Los animales que llegan a una puntuación clínica igual o superior a 4, presentan movilidad reducida al tener afectados los miembros traseros y delanteros. Esta puntuación determina un estadio muy avanzado de la enfermedad con alto grado de afectación neurológica. Por este motivo, estudiamos el tiempo que tardaban en llegar a esta situación los animales sema7AKO y los WT en función del protocolo

de inmunización. En el caso de los ratones deficientes en la sema7A, observamos que a medida que aumentaba la cantidad de péptido inmunogénico utilizado para inmunizar a los animales, también aumentaba la proporción y rapidez con la que los ratones alcanzaban una puntuación clínica de 4 (*Log Rank for trend*=0,006), de este modo, el 68,4% de animales sema7AKO inmunizados con la dosis de 10 µg presentaron una EAE con una puntuación clínica de 4 mientras que el 100% de los animales inmunizados con 50 y 100 µg llegaron a esta puntuación, observando una evolución de la enfermedad más rápida en la dosis de 100 µg ya que la totalidad de los animales sema7AKO alcanzaron la puntuación de 4 en menos de 15 días (*Log-Rank for trend*=0,006) (Figura 32a). Sin embargo, al estudiar los animales WT, 41 de 43 ratones presentaron un patrón idéntico en el que durante los primeros 13 días tras la inmunización, llegaron a una EAE de puntuación 4 o superior (Figura 32b).

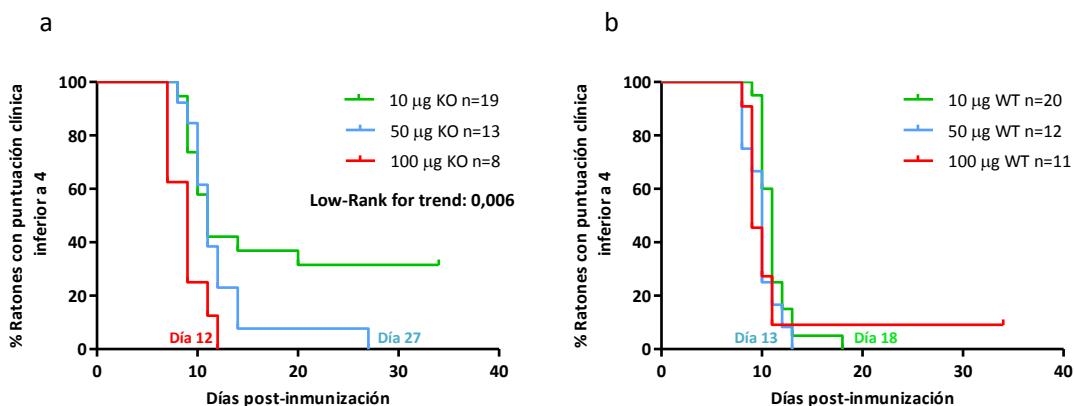


Figura 32. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) que evalúan el tiempo que tardan los animales en llegar a una puntuación clínica igual o superior a 4 dependiendo de la dosis de antígeno utilizada en la inmunización en ratones sema7AKO (KO) (a) y ratones WT (b).

2.2.2. El curso clínico de los ratones sema7AKO se ve influenciado por la cantidad de adyuvante utilizado en la inmunización

Los protocolos de inmunización establecidos nos permitieron estudiar cómo la dosis de adyuvantes influía en el desarrollo y curso clínico de la EAE. Se compararon los protocolos de inmunización de la Dosis Lab y de la dosis 50 µg en ratones sema7AKO y ratones WT. Observamos que al utilizar dosis más altas de adyuvantes los ratones sema7AKO presentaban de manera significativa un debut más temprano de la enfermedad ($p=0,046$) y un mayor grado de discapacidad

(puntuación acumulada: $p<0,001$; puntuación máxima: $p=0,005$) (Tabla 10). Además, en los ratones sema7AKO también observamos que los animales inmunizados con mayor cantidad de adyuvantes alcanzaban la puntuación clínica igual o superior a 4 más rápidamente que los ratones inmunizados con la dosis 50 μ g (Log Rank=0,004) (Figura 33c). Los ratones WT, por el contrario, no mostraron diferencias significativas entre ambas condiciones de inmunización, sin experimentar cambios debido a las diferencias en la dosis de adyuvantes (Figura 33d, Tabla 10).

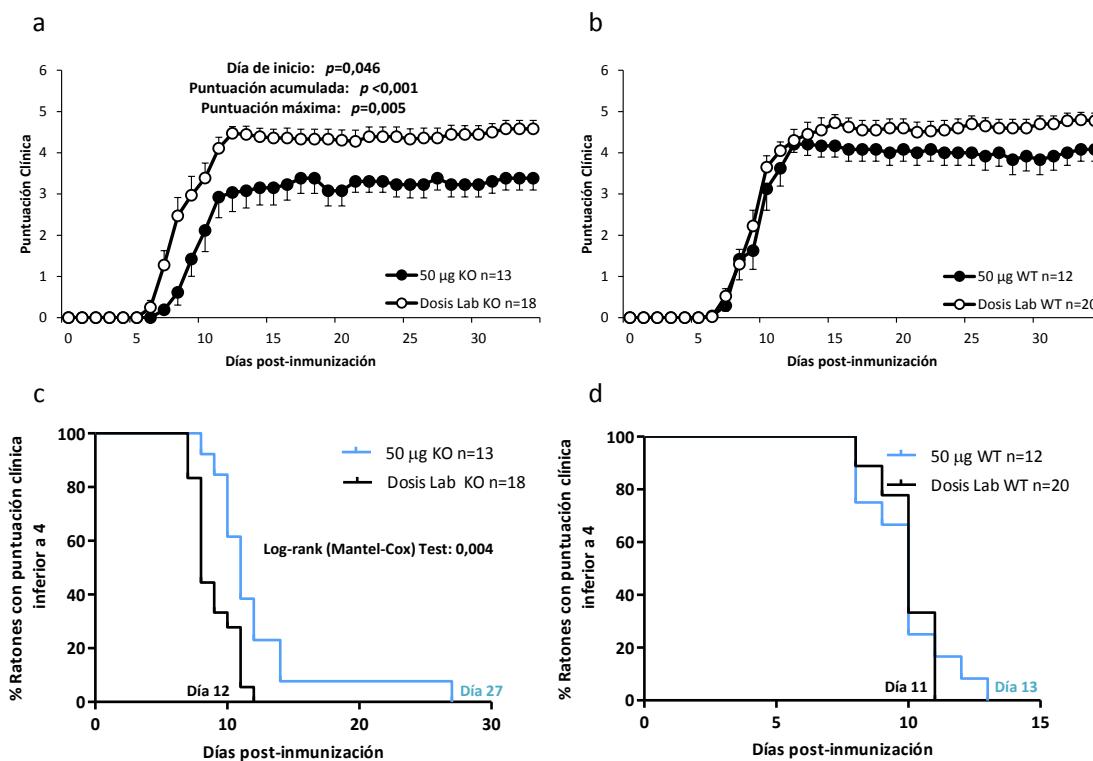


Figura 33. Seguimiento clínico de ratones sema7AKO (a) y WT (b) comparando la Dosis Lab con la dosis de 50 μ g de MOG₃₅₋₅₅. Las barras de error representan la SEM. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) que evalúan el tiempo que tardan los animales en llegar a una puntuación clínica igual o superior a 4 dependiendo de la cantidad de adyuvante utilizada en la inmunización en ratones sema7AKO (KO) (c) y WT (d).

Tabla 10. Variables clínicas de la EAE en ratones sema7AKO (KO) y WT inmunizados con la misma dosis de péptido pero diferente de adyuvantes.

Genotipo	Grupo (N)	% Incidencia	Día de inicio (SD)	Puntuación acumulada (SD)	Puntuación Máxima (SD)
KO	Dosis Lab (18)	100 (18/18)	7,89 (1,78)	115,89 (20,42)	4,69 (0,75)
	50 µg (13)	100 (13/13)	10,00 (3,81)	82,00 (26,30)	4,19 (0,56)
	<i>p</i>	ns	0,046	0<0,001	0,005
WT	Dosis Lab (20)	100 (20/20)	8,50 (1,99)	117,80 (25,05)	4,88 (0,78)
	50 µg (12)	100 (12/12)	8,50 (1,20)	102,88 (25,0)	4,50 (0,74)
	<i>p</i>	ns	ns	ns	ns

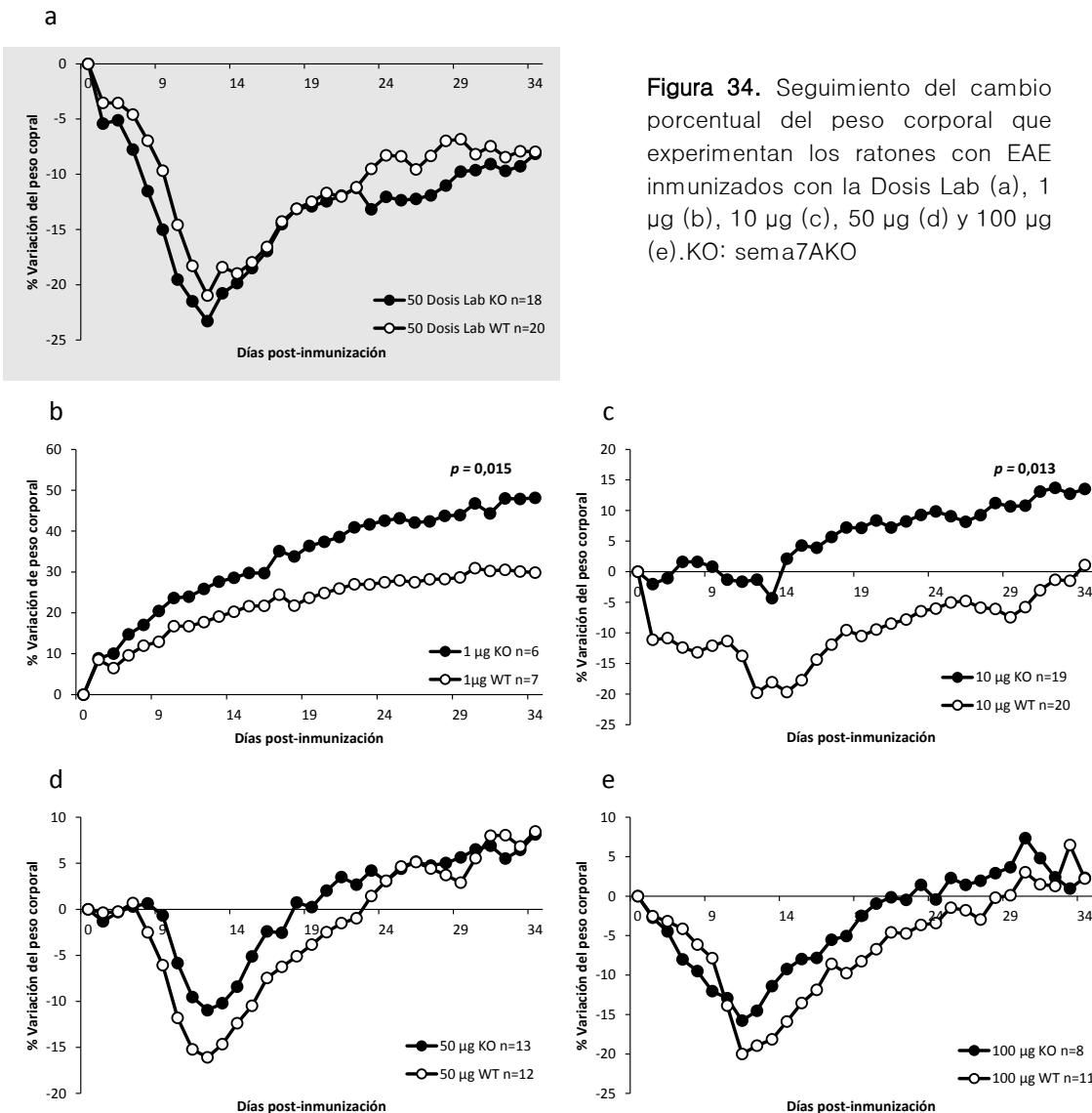
ns: no significativo.

2.2.3. Dosis necesaria para inducir la EAE en animales sema7AKO

Tal y como se ha descrito en el apartado 2.1., se observó que la incidencia en los animales sema7AKO inmunizados con la dosis de 10 µg fue del 79% mientras que en los ratones WT era del 100% ($p=0,047$). Teniendo en cuenta que no se observaron signos clínicos en ninguno de los genotipos al inmunizar con la dosis 1 µg, es evidente que la cantidad de antígeno encefalitogénico es importante en el desarrollo de la sintomatología clínica e histopatológica de la enfermedad.

Está ampliamente descrito que la aparición de los signos clínicos de EAE viene precedida por una pérdida de peso en los animales que se mantiene en el tiempo hasta la recuperación o estabilización de la enfermedad. Al estudiar la variación del peso de los animales durante el seguimiento clínico, observamos que los animales sema7AKO inmunizados con 1 µg sin afectación neurológica sufrieron un incremento de su peso corporal superior al que experimentaron los ratones WT ($p=0,015$). Cuando los animales se inmunizaron con la dosis de 10 µg, se observó que los ratones sema7AKO mostraron una mínima pérdida de peso tras el inicio de la enfermedad el cual recuperaron rápidamente, de forma contraria a lo que se observó en los ratones WT que sufrieron un descenso significativo de peso desde el momento de la inmunización ($p=0,013$). Sin embargo, en el resto de dosis empleadas donde la incidencia fue del 100% tanto en los ratones sema7AKO como en los ratones WT, se observó una pérdida de peso generalizada para todos los

animales, independientemente de su genotipo, que paulatinamente consiguieron recuperar con la estabilización de los signos clínicos (Figura 34).



3. *Histopatología*

El estudio histopatológico de los ratones sema7AKO y WT a final del experimento (día 34 p.i.) se realizó en los animales inmunizados con la Dosis Lab, la dosis 10 µg y la dosis de 50 µg de MOG₃₅₋₅₅. Mediante la tinción de HE, observamos la presencia de infiltración inflamatoria extensa compuesta por linfocitos y macrófagos en la sustancia blanca de la médula espinal y en el espacio subaracnoideo del encéfalo. La desmielinización se detectó mediante la tinción de KB observándose principalmente en la sustancia blanca de la médula espinal.

En la línea de lo observado en referencia a la puntuación clínica acumulada, no se detectaron diferencias entre ratones sema7AKO y WT inmunizados con la Dosis Lab o con la dosis 10 µg (Figura 35a,b,d,e), mientras que los ratones sema7AKO inmunizados con la dosis 50 µg presentaron menor grado de infiltración de células inflamatorias y de desmielinización (HE, $p=0,015$; KB, $p=0,002$) (Figura 35c,f).

4. *Respuesta inmune en animales sema7AKO*

4.2. **La respuesta proliferativa en ratones sema7AKO es menor que en los ratones WT**

Para comparar la capacidad de proliferación de los esplenocitos de los ratones sema7AKO y de los ratones WT, se eutanasiaron entre cuatro y seis ratones a día 12 p.i. para cada genotipo y condición de inmunización. Los esplenocitos se cultivaron en presencia del antígeno encefalitogénico (MOG₃₅₋₅₅), en presencia del estímulo policlonal (PHA) o en medio de cultivo como control basal de proliferación.

De forma general, los esplenocitos de los ratones sema7AKO proliferaron menos que los esplenocitos de los ratones WT en presencia del antígeno MOG₃₅₋₅₅, independientemente de la dosis empleada en la inmunización de los animales, siendo esta diferencia estadísticamente significativa para la dosis 50 µg ($p=0,017$) (Figura 36a). La respuesta policlonal frente a PHA también reveló una menor proliferación celular de los esplenocitos de los ratones sema7AKO respecto a los ratones WT, también resultando significativa en la dosis 50 µg ($p=0,022$) y mostrando una tendencia a la significación estadística en la dosis de 100 µg ($p=0,058$) (Figura 36b). La respuesta proliferativa frente a PHA en ratones sema7AKO y WT inmunizados con la Dosis Lab fueron prácticamente idénticas.

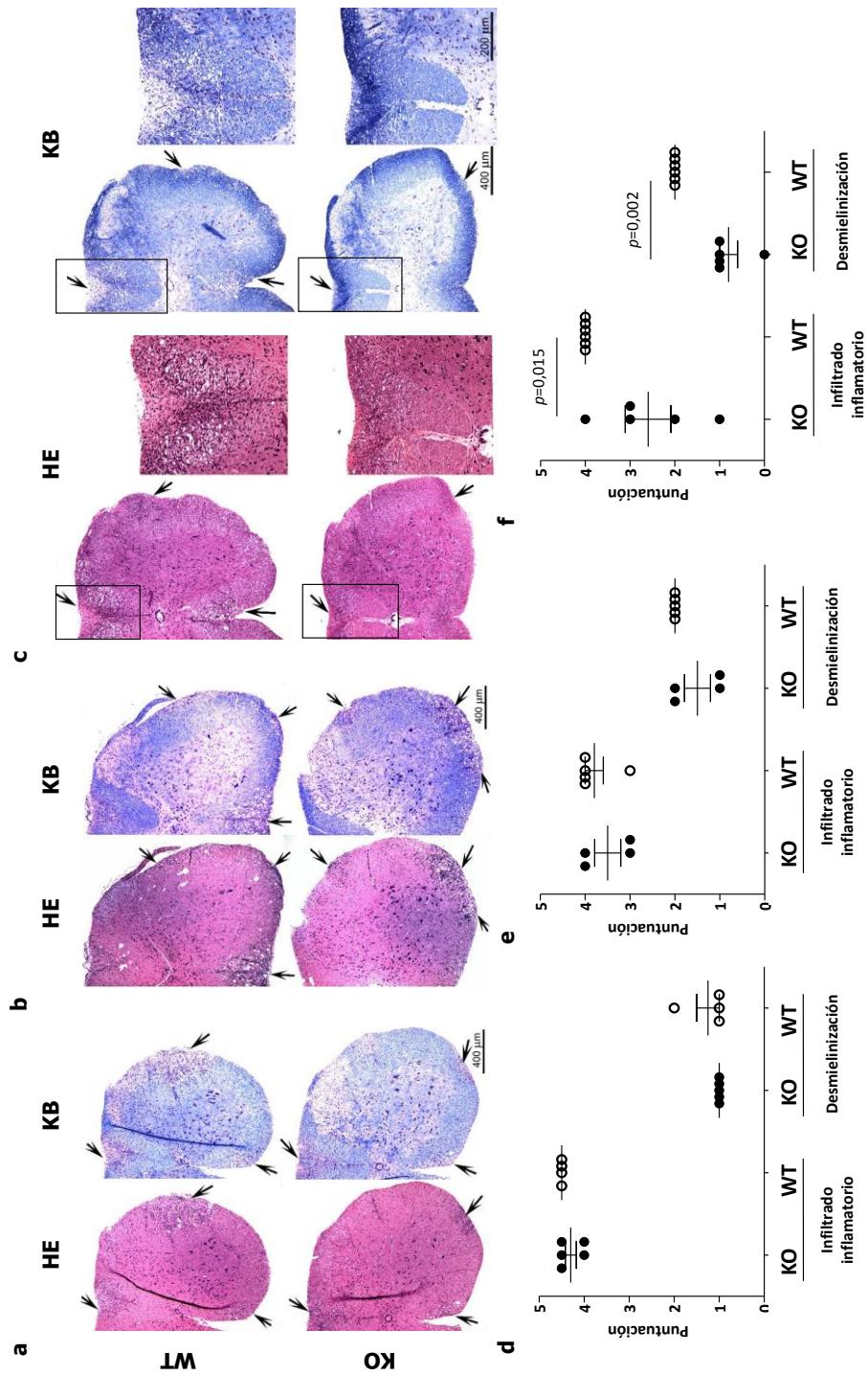


Figura 35. Ejemplo representativo de la histopatología de la médula espinal de ratones sema7AKO (KO) y ratones WT inmunizados con Dosis Lab (a), 10 µg (b) y 50 µg (c) a final de experimento (día 34 p.i.). El grado de infiltración celular se observó mediante la tinción con HE mientras que la desmielinización se detectó con la tinción KB. Las flechas indican en cada caso áreas de infiltración celular y desmielinización. Representación gráfica de la puntuación en la valoración de la infiltración celular y de la desmielinización para la Dosis Lab (d), 10 µg (e) y 50 µg (f) de los ratones analizados (n=4-6).

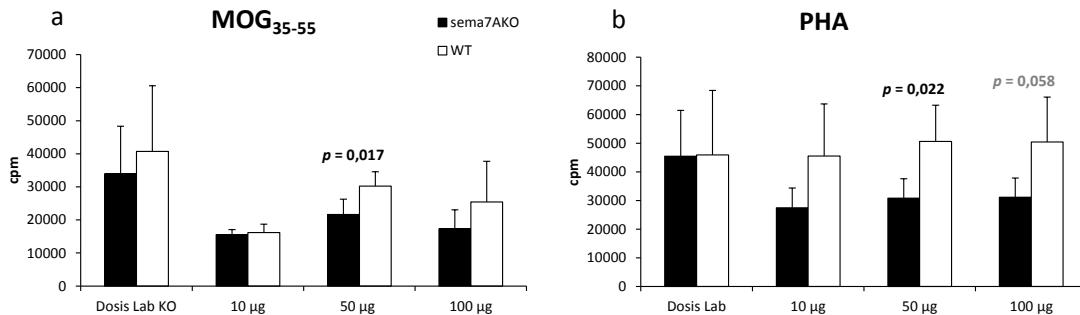


Figura 36. Proliferación de los esplenocitos de ratones sema7AKO y WT a día 12 p.i. frente al antígeno encefalitogénico MOG₃₅₋₅₅ (a) y frente al estímulo policlonal PHA (b) (n=4–6). Las barras de error representan la SD. cpm: cuentas por minuto.

4.2. Los ratones sema7AKO producen menor cantidad de citocinas pro-inflamatorias que los ratones WT

A partir del sobrenadante de los cultivos de los esplenocitos activados frente a MOG₃₅₋₅₅ a día 12 p.i., se cuantificaron las citocinas secretadas al medio mediante citometría de flujo. Se analizaron citocinas de los patrones celulares Th1, Th2 y Th17: IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17A.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las citocinas analizadas excepto en la citocina anti-inflamatoria IL-4 en la dosis de 10 µg, en la que se observó un aumento significativo ($p=0,020$) en los animales sema7AKO respecto a los ratones WT. Aun sin que las diferencias fueran estadísticamente significativas, cabe destacar que en todos los protocolos de inmunización se observó que los niveles de las citocinas pro-inflamatorias IFN- γ y TNF- α en los sobrenadantes de los ratones sema7AKO eran inferiores que los niveles obtenidos en los ratones WT (Figura 37a,b).

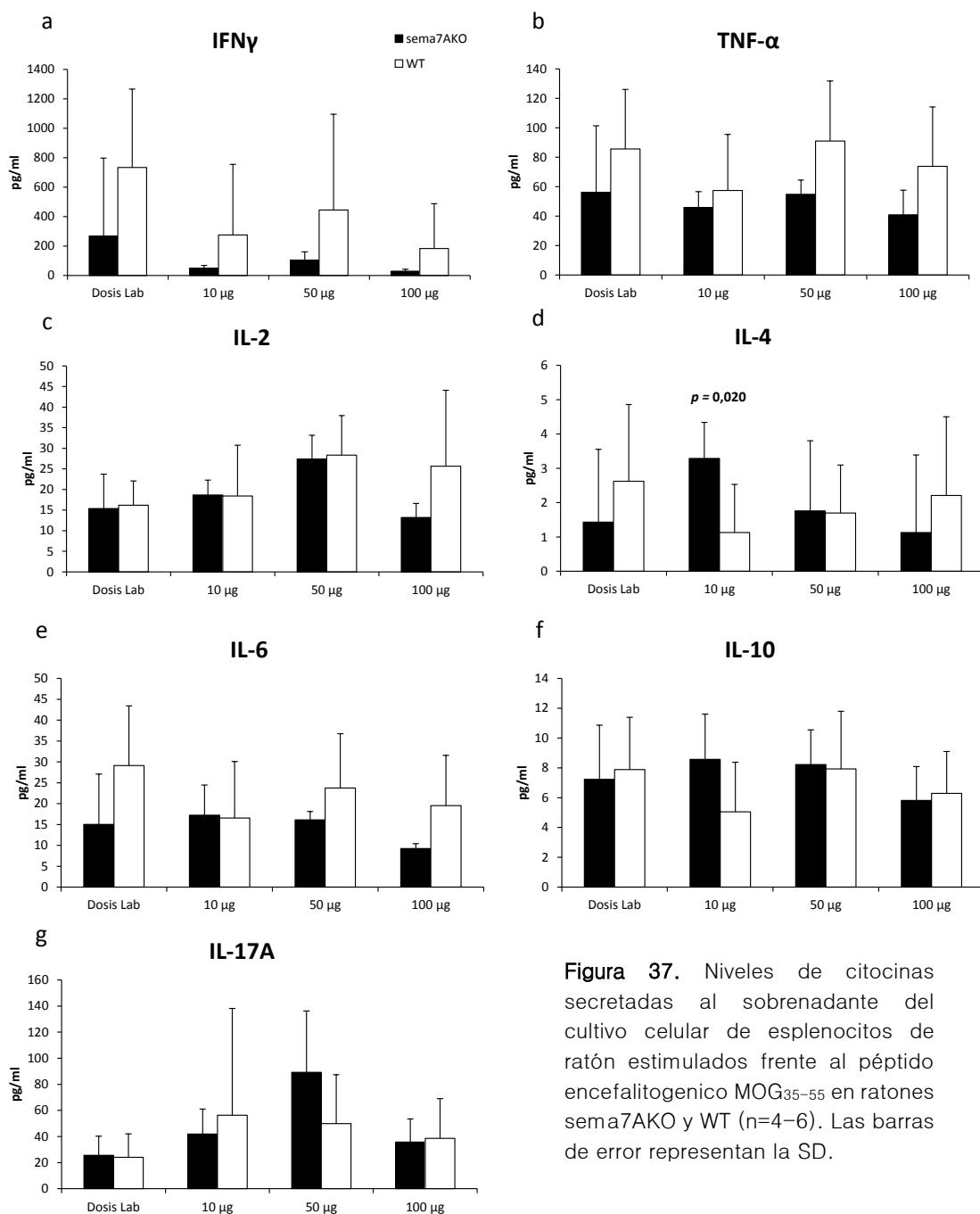


Figura 37. Niveles de citocinas secretadas al sobrenadante del cultivo celular de esplenocitos de ratón estimulados frente al péptido encefalitógenico MOG₃₅₋₅₅ en ratones sema7AKO y WT (n=4-6). Las barras de error representan la SD.

DISCUSIÓN

1000000000

Summary
 Semaphorins play an essential role in axonal guidance or sprouting. Semaphorin 7A (Sema7A) promotes the axonal growth in the central nervous system. Here, we show that Sema7A also plays a critical role in negative regulation of T cell activation and homeostatic and autoreactive T cell activation. Moreover, Sema7A leads to enhanced migratory responses. The deficiency in Sema7A hyperexcites T cells, mediate aggressive autoimmunity and T cell hyperactivity. Sema7A exhibits enhanced migratory responses, downmodulates adhesion and migration of T cells, and modulates autoreactive responses in the nervous systems.

Semaphorin 7A Is a Regulator of T Cell Receptor Signaling

1. La sema3A como factor inhibidor de la regeneración del SNC y de la activación de la respuesta inmune en la EM/EAE

Hemos observado que la expresión de la sema3A y la Np-1 en los astrocitos reactivos y en la microglía/macrófagos predominaba en lesiones de EM respecto a otras enfermedades que cursan con desmielinización (AI y LMP), lo que nos sugiere que la vía de señalización de la sema3A tendría una función más relevante en los procesos desmielinizantes que ocurren en el SNC de pacientes con EM. Hemos evidenciado que en las lesiones de EM la sema3A la expresaban las neuronas, los astrocitos reactivos y la microglía/macrófagos y que su receptor, la Np-1, se expresaba en la microglía/macrófagos. Además, hemos descrito que la expresión de la sema3A y la Np-1 aumentaba con el grado de la actividad inflamatoria de la lesión de EM. Recientemente, y en la misma línea, se ha reportado que la expresión de la sema3A está aumentada en neuronas de la sustancia gris, en los astrocitos y en la microglía que rodea o reside en lesiones inflamatorias activas de EM así como en un modelo animal de desmielinización inducido por lisolecitina (Boyd *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2007). Al igual que en nuestro estudio, también se ha descrito una correlación entre la actividad inflamatoria de la lesión y la expresión de la sema3A (Boyd *et al.*, 2013). Sin embargo, mientras que otros autores han observado expresión de la sema3A en células del linaje oligodendroglial y de la Np-1 en las OPC en modelos experimentales de desmielinización inducida por toxicidad (Boyd *et al.*, 2013; Syed *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2007) y de la Np-1 en las OPC de lesiones de pacientes con EM (Boyd *et al.*, 2013), nosotros no hemos podido detectar su expresión en los oligodendrocitos.

Posteriormente, estudiamos la expresión de la sema3A y de sus receptores en la EAE, tanto en el SNC como en el sistema inmune en diferentes momentos del curso clínico de la enfermedad. Para ello indujimos la EAE en ratones C57BL/6 que desarrollaron un curso clínico crónico no remitente el cual nos permitió estudiar, la fase de inducción de la respuesta inmune, la fase inflamatoria y la fase crónica cuando los procesos inflamatorios han disminuido y la lesión en el SNC se hace permanente.

De forma similar a lo observado en las lesiones de pacientes con EM, hallamos que la expresión de la sema3A y de sus receptores, la Np-1 y la PLXN-A1, estaba aumentada en la sustancia blanca perilesional en el SNC. Los hallazgos observados tanto en lesiones de pacientes con EM como en el SNC de ratones con EAE, nos hacen hipotetizar que la vía de señalización de la sema3A podría estar implicada en el fallo de los procesos neurorregenerativos limitando la capacidad de regeneración axonal y la remielinización. Se han publicado una serie de estudios que demuestran la función inhibidora que media la sema3A sobre los axones neuronales (Kaneko *et al.*, 2006; Montolio *et al.*, 2009; De Winter *et al.*, 2002) y sobre las OPC en el SNC (Boyd *et al.*, 2013; Piaton *et al.*, 2011; Syed *et al.*, 2011). En modelos de daño axonal por sección medular, la sema3A que expresan los fibroblastos penetra en la lesión e impide que las fibras nerviosas atraviesen la cicatriz glial (De Winter *et al.*, 2002). Además se ha demostrado que la inhibición de la sema3A aumenta la regeneración axonal y la remielinización y, además disminuye la apoptosis celular (Kaneko *et al.*, 2006; Montolio *et al.*, 2009). Por otro lado, la expresión de la sema3A y de su receptor, la Np-1, está relacionada con un descenso en el reclutamiento de OPC hacia las áreas lesionadas del SNC (Piaton *et al.*, 2011). En este sentido se ha descrito que en un modelo experimental de desmielinización inducido por lisolecitina, el reclutamiento de las OPC a la zona de desmielinización era insuficiente cuando se administraba sema3A recombinante (Boyd *et al.*, 2013). Además, la presencia de la sema3A tiene un efecto inhibidor en la remielinización al provocar un bloqueo reversible en la diferenciación de las OPC (Syed *et al.*, 2011). El aumento en la expresión de la sema3A en la sustancia blanca perilesional tanto en lesiones de EM como en la EAE nos estaría indicando que la sema3A podría estar directamente relacionada con los procesos que inhiben la regeneración axonal, el reclutamiento y la diferenciación de oligodendrocitos. Por otro lado, en nuestros estudios no fuimos capaces de detectar los receptores de la sema3A en los oligodendrocitos en las lesiones de pacientes con EM ni en las de ratones con EAE y pensamos que podría deberse a problemas con la fijación o preparación de los tejidos ya que nuestro grupo ha puesto apunto la inmunotinción tanto de la sema3A como de la Np-1 en cultivos primarios de células oligodendrogliales de ratón (datos no mostrados).

Por otro lado, se ha descrito que en un contexto de estrés neuronal, el aumento de la expresión de la sema3A en neuronas podría mediar la muerte por apoptosis de la microglía a través de la interacción con sus receptores, la Np-1 y la PLXN-A1 (Majed *et al.*, 2006) de modo que la presencia de la sema3A podría tener una función neuroprotectora. En las lesiones de EM hemos observado que tanto la expresión de la sema3A en las neuronas, como de la Np-1 en la microglía/macrófagos estuvo aumentada en las lesiones crónicas activas y se redujo en las lesiones crónicas inactivas. Es probable que en las lesiones de EM con alta actividad inflamatoria las neuronas secreten sema3A y que ésta tenga un papel neuroprotector induciendo la apoptosis de la microglía reactiva, mientras que en lesiones crónicas inactivas, donde desaparece el componente inflamatorio, queda reducida su expresión. De esta manera, la sema3A podría estar implicada tanto en procesos de neurodegeneración como de neuroprotección, por lo que es difícil atribuirle una función concreta en la EM y en la EAE. Por otro lado, los datos descritos en la literatura, sugieren que el papel de la sema3A en la inhibición de la regeneración del SNC sería más relevante que la función neuroprotectora que pueda tener (Eixarch, Gutiérrez-Franco, *et al.*, 2013).

La sema3A está involucrada en la modulación de la respuesta inmune (Catalano *et al.*, 2006; Lepelletier *et al.*, 2006), por lo que la alteración en la expresión de esta semaforina podría ser particularmente relevante en enfermedades autoinmunes. En este sentido, se ha descrito que pacientes con AR presentan niveles disminuidos de la sema3A en el líquido sinovial (Takagawa *et al.*, 2013) y que además tienen un déficit en la expresión de la sema3A en las células T activadas (Catalano, 2010). En el modelo animal de la AR, la sobre-expresión de la sema3A mejoró los signos clínicos y redujo la inflamación articular (Catalano, 2010). Por otro lado, en el modelo de EAE se ha descrito que los animales que carecen de la Np-1 en células T CD4+ presentan un curso clínico más agresivo mientras que los ratones que sobre-expresan la Np-1 en células T exhiben una gran resistencia a desarrollar la enfermedad (Solomon *et al.*, 2011).

A pesar de no detectar la expresión de Np-1 en los linfocitos T en las lesiones de EM, sí la detectamos en el modelo de EAE en las células T y B del infiltrado

inflamatorio en el SNC y en las células inmunes periféricas. Está descrito que la sema3A modula la activación de los linfocitos T impidiendo la perpetuación de la respuesta inmune (Catalano *et al.*, 2006; Lepelletier *et al.*, 2006). Nuestros resultados en el curso clínico de la EAE muestran en los esplenocitos un descenso en los niveles de expresión de la sema3A y de sus receptores, la Np-1 y la PLXN-A1 una vez inducida la enfermedad. Sin embargo, observamos un aumento en la expresión de la sema3A y la Np-1 tras el desarrollo de la EAE en las células inflamatorias que infiltran el SNC. El descenso en los niveles de expresión en periferia favorecería la cronificación de la activación del sistema inmune mientras que el aumento en las células inmunes infiltradas en el SNC podría ser indicativo de un intento de inhibir la respuesta inmune de manera local. Por otro lado, recientemente la Np-1 se ha propuesto como un marcador que distingue la población de células nTreg de otras clases de células Treg (Yadav *et al.*, 2012), por lo que tal vez el aumento de células inmunes positivas para la Np-1 detectadas en el SNC de ratones con EAE, podría indicar un aumento de las células nTreg que infiltran el tejido tratando de modular la respuesta inmune y mantener así la tolerancia frente a antígenos propios. Además, también se ha descrito que la expresión de la Np-1 se ve incrementada durante la diferenciación de los monocitos a macrófagos de fenotipo anti-inflamatorio M2 (Ji *et al.*, 2009), por lo que la microglía/macrófagos del infiltrado que expresan la Np-1 también podrían participar en la limitación de los procesos pro-inflamatorios de la respuesta inmune en las lesiones en el SNC en la EAE.

La sema3A se secreta como un homodímero de 95 kDa que puede fragmentarse y dar lugar a una isoforma de 65 kDa, que posee una menor actividad biológica que la isoforma de 95 kDa, la cual puede funcionar como antagonista parcial de la proteína completa y así inhibir la actividad que media la vía de señalización sema3A/Np-1/PLXN-A1 (Adams *et al.*, 1997; Klostermann *et al.*, 1998; Lepelletier *et al.*, 2006). Nuestros datos muestran que la expresión de la isoforma de 95 kDa fue menos abundante que la de 65 kDa en el sistema inmune en todas las fases estudiadas de la enfermedad, aunque la reducción de la expresión se observó en ambas isoformas por igual. Sin embargo, recientemente se ha descrito que la isoforma de 65 kDa tiene la misma actividad que la proteína completa de 95 kDa

en el crecimiento de neuritas de neuronas secretoras de hormonas (Giacobini *et al.*, 2014), de modo que la actividad biológica de la isoforma de 65 kDa podría depender del contexto en el que se encuentre y en el caso de la limitación de la respuesta inmune mediada por células T podría ser igual de efectiva que la sema3A de 95 kDa tratándose de una hipótesis por confirmar. Aunque la expresión proteica de la sema3A (95 kDa y 65 kDa) se redujo hasta en un 80% después de la inducción de la EAE, no se detectaron diferencias significativas en la expresión génica durante el progreso de la enfermedad. Esto podría deberse a que la expresión de la sema3A ocurre de forma tan escasa en las células inmunes que la técnica de cuantificación por qPCR podría no ser capaz de detectar de manera precisa un descenso en su expresión génica. En este sentido, existe gran controversia sobre la utilidad de la técnica de qPCR para la validación de la expresión de genes que tienen una expresión mínima y que se detectan a partir del ciclo 30 (Nolan *et al.*, 2006), como es el caso de la sema3A. Sin embargo, también hay estudios que describen que los niveles de expresión proteica pueden no correlacionarse con la expresión génica (Vogel and Marcotte, 2012) debido a diversos mecanismos que afectan la estabilidad del ARN y que podrían estar ocurriendo durante la expresión génica de la sema3A.

Para determinar la función de la sema3A como diana terapéutica en la patogenia de la EM se podría estudiar el papel que desempeña en el modelo animal de la EAE. Sin embargo, la ausencia del gen sema3A en ratones de la cepa C57BL/6 provoca múltiples defectos en el desarrollo de las inervaciones neuronales y una notable disminución en la formación de huesos que conlleva a que estos ratones posean la mitad de la masa corporal correspondiente a un animal WT (Taniguchi *et al.*, 1997). Aunque los ratones deficientes en la sema3A pueden llegar a vivir lo suficiente para reproducirse y tener descendencia, la mayoría mueren al cabo de los pocos días debido a su deficiencia en el crecimiento. De hecho, la delección del gen sema3A en ratones con un *background* 129 o CD1 resulta letal al morirse los ratones al poco de nacer (Behar *et al.*, 1996; Taniguchi *et al.*, 1997). Para evitar los problemas de viabilidad de los ratones deficientes para sema3A, se han generado ratones KO condicionales y KO condicionales específicos de tejidos en un *background* genético CD1 (Boyd *et al.*, 2013; Fukuda *et al.*, 2013; Imai *et al.*,

2009). Aunque esta vía sería idónea para nuestros estudios no hemos podido acceder a estos animales.

Otras formas de estudiar la función de la sema3A en el curso clínico de la EAE sería disminuyendo su expresión mediante la administración de ARNs de interferencia (Catalano *et al.*, 2006). En un estudio piloto en el que administramos por vía intravenosa a razón de 2 mg/Kg de una mezcla de cuatro ARNs de interferencia específicos para la sema3A a día 7 y 14 p.i., no observamos efectos en el desarrollo de la EAE respecto al grupo control, aunque tampoco se pudo confirmar el descenso de la expresión génica de la sema3A. Debido al alto coste que supone administrar ARNs de interferencia *in vivo* y tras los resultados preliminares, se decidió buscar vías alternativas. Entre ellas, nos planteamos el bloqueo de la vía de señalización de la sema3A utilizando anticuerpos anti-sema3A o anti-Np-1, o mediante la administración de inhibidores específicos (Kaneko *et al.*, 2006; Montolio *et al.*, 2009). En el caso contrario, para observar sus posibles efectos en la activación de la vía de señalización, pensamos en suministrar la sema3A de forma exógena, mediante la administración de un plásmido que codifica para la sema3A como se había publicado previamente (Catalano, 2010) o mediante la administración directa de la proteína sema3A recombinante (Boyd *et al.*, 2013). Sin embargo, la dificultad para encontrar buenas herramientas disponibles para el estudio de la sema3A y las limitaciones económicas no nos permitieron realizar ninguno de estos abordajes experimentales para estudiar la implicación de la sema3A en el modelo de EAE *in vivo*.

2. La sema7A como posible diana terapéutica para el tratamiento del componente inflamatorio y neurodegenerativo de la EM/EAE

La sema7A está presente en el encéfalo y la médula espinal de ratones adultos (Xu *et al.*, 1998), señaliza a través de integrinas (Pasterkamp *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2007) y también se ha observado que está aumentada en modelos de lesión medular en rata (Kopp *et al.*, 2010). Aunque es una proteína anclada a la membrana, se sabe que existe una forma soluble de la sema7A (Kopp *et al.*, 2010; Ohsawa *et al.*, 2009; Pasterkamp *et al.*, 2003). En la actualidad, se conoce poco sobre la función de la sema7A en el contexto de enfermedades autoinmunes,

limitándose a la detección de auto-anticuerpos que reconocen el precursor de la sema7A en el líquido sinovial de pacientes con AR (Kim *et al.*, 2006), a los resultados obtenidos por nuestro grupo en el que se describió una disminución de los niveles de la sema7A soluble en el LCR de pacientes con un síndrome clínico aislado que convirtieron a EM respecto a los que no convirtieron (Comabella *et al.*, 2010) y a otros dos estudios realizados en el modelo de EAE (Czopik *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2007).

En esta tesis doctoral se ha descrito por primera vez la expresión de la sema7A y de su receptor, la $\alpha 1\beta 1$ -integrina, en lesiones de pacientes con EM. Observamos que se expresa principalmente en astrocitos reactivos aunque la sema7A y la $\alpha 1$ -integrina también se detectaron en los oligodendrocitos y, de manera ocasional, en las neuronas. En la microglía/macrófagos solo se detectó la expresión de la $\beta 1$ -integrina. Al comparar las lesiones de EM con otras lesiones de enfermedades que cursan con desmielinización (AI y LMP) y con tejido de pacientes sin afectación neurológica pudimos observar que la expresión de estas proteínas estaba aumentada en la EM respecto a las otras muestras estudiadas. De igual forma que para la sema3A, la expresión de la sema7A y sus receptores en los astrocitos reactivos se asociaba con el grado de la actividad inflamatoria de la lesión. Coincidiendo con la caracterización en lesiones de EM, en el modelo de EAE observamos expresión de la sema7A, de la $\alpha 1$ - y la $\beta 1$ -integrina en las neuronas y los astrocitos reactivos, la expresión de la sema7A y la $\alpha 1$ -integrina en oligodendrocitos y la expresión de la $\beta 1$ -integrina en la microglía/macrófagos.

Se sabe que en un modelo animal de daño medular por sección la sema7A se expresa en las neuronas y en los astrocitos reactivos alrededor de la cicatriz glial inmediatamente después de inducir la lesión. Este patrón de expresión encaja con el curso temporal de la remodelación del tejido lo que sugiere la participación de la sema7A en la formación y la maduración de la cicatriz glial (Kopp *et al.*, 2010). En este contexto, nuestros resultados muestran que la expresión de la sema7A y de sus receptores estaba aumentada en astrocitos reactivos de las lesiones de alta actividad inflamatoria en pacientes con EM respecto a las muestras control sin afectación neurológica y respecto las lesiones de EM con menor actividad

inflamatoria y en la sustancia blanca perilesional durante la fase inflamatoria de la EAE. Se observó un descenso de la expresión de la sema7A en los oligodendrocitos de las lesiones crónicas activas respecto a las muestras de pacientes sin afectación neurológica. Paralelamente, en el modelo de EAE observamos un descenso de la expresión de la sema7A en la fase crónica de la enfermedad respecto a fases con mayor actividad inflamatoria. Estos datos corroborarían la participación de la sema7A en la formación de la cicatriz glial en lesiones de EM y de EAE, y por los cambios de expresión observados en los oligodendrocitos, podría tener un papel importante en la remielinización.

La sema7A también está implicada en la modulación de la respuesta inmune (Holmes *et al.*, 2002; Morote-Garcia *et al.*, 2012; Suzuki *et al.*, 2007), por ello quisimos determinar su expresión en las células inmunes infiltradas en lesiones de pacientes con EM así como en el modelo animal, y buscar una asociación entre el perfil de expresión y la progresión de la enfermedad. No observamos colocalización del marcador CD3 (células T) con la expresión de la sema7A ni con sus receptores en las lesiones de pacientes con EM. Sin embargo, en el SNC de los ratones con EAE, se detectó la expresión de la sema7A y de sus receptores en las células T y B infiltrantes. En las células inmunes periféricas también se detectó la expresión de estas proteínas en los linfocitos T y B, en las células mieloides y en las DC. Es probable que en el caso de las muestras de pacientes la fijación prolongada del tejido deteriorase algunos epítopos de forma que imposibilitara su colocalización.

La sema7A induce la migración y producción de citocinas pro-inflamatorias en los macrófagos, por lo que el aumento de la $\beta 1$ -integrina que hemos observado en la microglía/macrófagos tanto en lesiones de pacientes con EM como en el modelo animal podría indicar que la sema7A expresada por los astrocitos reclutaría a la microglía/macrófagos en la lesión y/o induciendo la expresión de citocinas pro-inflamatorias, lo que favorecería la respuesta inmune. A nivel de sistema inmune periférico, los resultados obtenidos en el modelo de EAE nos sugieren que la vía de señalización de la sema7A a través de las integrinas tendría una función relevante en la fase inicial y en el mantenimiento de la respuesta inmune, ya que hemos observado un aumento de su expresión en esplenocitos tras la inducción de

la enfermedad en los animales, tanto a nivel proteico como de expresión génica. La sema7A y sus receptores también se encontraron aumentados en las células inflamatorias que infiltraban el SNC. Sin embargo, en estudios previos se sugiere que la sema7A no intervendría en la activación de las células T ni en el reclutamiento de éstas a la zona lesionada, sino que actuaría durante la fase efectora induciendo la producción de IL-6 por parte de los macrófagos activados en el sitio de inflamación (Suzuki *et al.*, 2007). Otro estudio propone que, bajo condiciones de hipoxia, la interacción entre la sema7A producida por células endoteliales y la PLXN-C1 en neutrófilos facilitaría la migración trans-endotelial de éstos, lo que provocaría la acumulación de células polimorfonucleares en el sitio de inflamación y, por tanto, favorecería la respuesta inmune pro-inflamatoria (Morote-García *et al.*, 2012). En esta tesis doctoral no se evaluaron los cambios de expresión de la PLXN-C1, ya que a pesar de realizar numerosas pruebas no conseguimos establecer las condiciones adecuadas para analizar su expresión por inmunohistoquímica, citometría de flujo o western blot por lo que no pudimos determinar la relevancia de este receptor en la respuesta pro-inflamatoria mediada por la sema7A en la EAE.

El aumento en la expresión de la sema7A en las lesiones de EM y en la EAE podrían parecer contradictorios al hecho de que los pacientes con un síndrome clínico aislado que convirtieron a EM clínicamente definida presentaron una disminución en los niveles de la sema7A en el LCR respecto a los que no convirtieron (Comabella *et al.*, 2010). Proponemos que los pacientes que convierten a EM tendrían más cantidad de la sema7A anclada a la membrana por su dominio GPI que sema7A soluble, lo que favorecería los procesos inflamatorios mediados por el contacto entre células T autorreactivas y macrófagos del SNC (Suzuki *et al.*, 2007). Las formas solubles de ciertas proteínas o receptores de membrana en muchas ocasiones compiten por la unión con su ligando ejerciendo como antagonista de su forma anclada a la membrana (Jones and Rose-John, 2002; Mohler *et al.*, 1993). Por tanto, el descenso de la forma soluble de la sema7A en LCR de los pacientes que convierten a EM podría favorecer la interacción entre la sema7A de las células T autorreactivas con su receptor en los macrófagos y promover así la inducción de la producción de citocinas pro-inflamatorias.

Por otro lado, la expresión de las integrinas $\alpha 1$ y $\beta 1$ aumentó en las células inflamatorias infiltradas en el SNC de ratones con EAE según avanzaba la enfermedad. En el sistema inmune periférico, los niveles de la $\beta 1$ -integrina también aumentaron en las poblaciones de células inmunes estudiadas tras la inmunización de los animales. Ya que las integrinas son moléculas de adhesión celular y están involucradas en los procesos migratorios (Hemler, 1990), pensamos que la expresión aumentada de éstas podría estar relacionada con la entrada de las células inmunes al SNC. Por otro lado, la $\alpha 1\beta 1$ -integrina parece estar implicada en el anclaje de los macrófagos a la matriz extracelular inhibiendo su migración e impidiendo su salida de las áreas inflamadas. Además, se piensa que mediante la interacción de la $\alpha 1\beta 1$ -integrina de los macrófagos con la sema7A de los linfocitos T, éstos quedarían retenidos en las zonas de inflamación (Becker *et al.*, 2013), sin embargo nosotros no hemos observado que la expresión de la $\beta 1$ -integrina se modifique en las células mieloídes periféricas durante el curso de la EAE. Por ello podríamos pensar que en el SNC tampoco existirían cambios en la expresión de la $\beta 1$ -integrina en las APC, por lo que esta vía de activación de la respuesta inflamatoria no sería relevante en nuestras condiciones experimentales.

Para estudiar el papel de la sema7A en la patogenia de la EAE se indujo la enfermedad en animales deficientes en la sema7A. Previamente, se habían publicado resultados controvertidos sobre el efecto de la deficiencia de la sema7A en el desarrollo de la EAE. Mientras que en uno de los trabajos se observó un empeoramiento de la enfermedad en los ratones sema7AKO respecto a los ratones WT debido a una elevada tasa de mortalidad de los animales deficientes en sema7A con EAE (Czopik *et al.*, 2006), en el otro se describía un curso clínico más leve en los ratones sema7AKO respecto a los controles aunque no observaron diferencias en la proliferación celular o en la producción de citocinas pro-inflamatorias entre ambos genotipos (Suzuki *et al.*, 2007). En el estudio de Czopik y colaboradores (Czopik *et al.*, 2006) a pesar de la elevada tasa de mortalidad presente en el grupo de los animales sema7AKO, los animales supervivientes mostraron una recuperación casi completa, presentando un curso clínico remitente que difería del curso crónico no remitente descrito tanto en el estudio de Suzuki y colaboradores (Suzuki *et al.*, 2007) como en el nuestro. Sin embargo, se ha reportado que la

inducción de la EAE con dosis bajas de péptido encefalitogénico en ratones de la cepa C57BL/6 podría conllevar un curso clínico remitente monofásico, o con brotes (Berard *et al.*, 2010).

En nuestro estudio, en primer lugar se inmunizaron ratones sema7AKO y WT utilizando las condiciones establecidas en nuestro laboratorio para el modelo de EAE en ratones con un *background* genético C57BL/6 inmunizados con MOG₃₅₋₅₅. Con estas condiciones observamos que los animales sema7AKO y WT presentaban un curso clínico crónico no remitente, característico del *background* genético y el antígeno utilizado, y que era muy similar entre ambos genotipos en cuanto a la incidencia, el día de inicio, la puntuación clínica acumulada, la puntuación clínica máxima y el porcentaje de mortalidad, a diferencia de lo reportado en estudios anteriores (Czopik *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2007). En estos trabajos previos los protocolos de inmunización diferían del nuestro en las dosis de antígeno encefalitogénico y en la dosis de adyuvante utilizada, por lo que consideramos relevante investigar si nuestros resultados podrían estar influenciados por estos cambios. De este modo, testamos diferentes cantidades de péptido encefalitogénico (1 µg, 10 µg, 50 µg y 100 µg) y empleamos menor cantidad de McT (100 µg) y de Tp (100 ng). Mientras que con la dosis de 1 µg los ratones no manifestaron ningún signo de afectación clínica ni histopatológica tal y como ya habían descrito Suzuki y colaboradores (Suzuki *et al.*, 2007), en el resto de dosis los signos clínicos siguieron un curso crónico no remitente, tal como habíamos observado en los animales inmunizados con la Dosis Lab y como habíamos reportado previamente en ratones con un *background* genético C57BL/6 inmunizados con MOG₃₅₋₅₅ (Eixarch *et al.*, 2009; Eixarch, Mansilla, *et al.*, 2013; Fissolo *et al.*, 2012). En ninguno de los casos se obtuvieron diferencias significativas en las variables clínicas e histopatológicas estudiadas, excepto cuando se utilizó la dosis de 50 µg de MOG₃₅₋₅₅, en la que la puntuación acumulada fue significativamente menor en el grupo de ratones sema7AKO comparado con los WT, sugiriendo que la sema7A podría estar interfiriendo de algún modo en el desarrollo de la EAE.

Por otro lado, Czopik y colaboradores habían descrito un 60% de mortalidad en los ratones sema7AKO respecto al 0% observado en los ratones WT. Cuando excluían los animales que habían fallecido a causa de la EAE, la gravedad de la enfermedad no difería entre los ratones sema7AKO y los ratones WT (Czopik *et al.*, 2006). Sin embargo, en nuestro estudio, en ninguno de los protocolos de inmunización utilizados observamos diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de mortalidad entre ambos genotipos.

Los ratones sema7AKO inmunizados con la dosis de 10 µg presentaron una menor incidencia (79% respecto al 100% en los ratones WT) y una mínima pérdida de peso asociada a un curso clínico menos agresivo (Moreno *et al.*, 2012), lo que podría indicar que es necesario elevar la dosis de péptido encefalitogénico MOG₃₅₋₅₅ para conseguir un mejor establecimiento de los signos clínicos de la EAE en ausencia de la sema7A.

Los resultados anteriores indicarían que los ratones deficientes en la sema7A parecen más sensibles a los cambios en los protocolos de inmunización, por lo que quisimos estudiar en mayor profundidad este aspecto. Con este fin, estudiamos el tiempo necesario para que los animales alcanzaran un alto grado de afectación neurológica correspondiente a una puntuación clínica igual o superior a 4, y observamos que existía un efecto dosis dependiente en los ratones sema7AKO en comparación con los ratones WT. Para estudiar el efecto de la dosis de adyuvantes en la inducción de la EAE comparamos los grupos de animales inmunizados con la Dosis Lab y con la dosis de 50 µg, en las que solo difería la cantidad de adyuvantes (McT y Tp). Del mismo modo que para la dosis de antígeno, y a diferencia del grupo control, los ratones sema7AKO inmunizados con mayor cantidad de adyuvante alcanzaron más rápidamente y de manera significativa una puntuación clínica igual o superior a 4. Estos resultados sugieren que cambios en las condiciones de inmunización, como la cantidad de antígeno o de adyuvante, son suficientes para influir en el curso clínico de la EAE en ratones sema7AKO, lo que indica que la sema7A tendría un papel en el desarrollo de la respuesta inmune en la EAE, aunque no sería una molécula imprescindible, ya que el efecto en el curso clínico de la enfermedad desapareció al aumentar la dosis de

inmunización. Estos datos sugieren que existen otras vías compensatorias y/o más relevantes que la mediada por la sema7A en la activación de la respuesta inmune durante el establecimiento de la enfermedad.

La histopatología en médula espinal y en el encéfalo a día 34 p.i. (final de experimento) no mostró cambios significativos en cuanto al grado de infiltración celular o desmielinización entre ratones sema7AKO y WT cuando se utilizó la Dosis Lab o la dosis de 10 µg. Sin embargo, inmunizando con 50 µg del péptido MOG₃₅₋₅₅ y, acorde con los resultados obtenidos en la puntuación clínica acumulada, los ratones sema7AKO presentaron menor infiltración celular y desmielinización que los ratones WT. En los estudios previos en los que se estudió la EAE en ratones deficientes en sema7A, los resultados histopatológicos de la enfermedad se realizaron entre día 11 y 17 p.i. (Czopik *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2007), cuando el componente inflamatorio es más relevante respecto al momento en el que nosotros realizamos nuestro estudio (día 34 p.i.) por lo que imposibilita la comparación de los resultados.

Ya que la sema7A favorece la migración de monocitos/macrófagos (Holmes *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2007), nuestros resultados en el análisis histopatológico a final de experimento indicarían que la ausencia de la sema7A durante el curso clínico de la EAE dificultaría la migración de los macrófagos hacia el SNC, lo que provocaría una menor infiltración del resto de células inmunes y por lo tanto menos desmielinización del SNC en los ratones sema7AKO. Además, como ya se ha mencionado, la sema7A también está implicada en la formación de la cicatriz glial (Kopp *et al.*, 2010) por lo que en ausencia de la proteína, cabe esperar que la lesión en SNC tenga más facilidad de regenerar al tener una cicatriz glial más inmadura.

Para estudiar de qué manera influye la sema7A en la respuesta inmune, se realizaron ensayos de proliferación celular y de producción de citocinas. Observamos que la respuesta proliferativa antígeno específica (MOG₃₅₋₅₅) y polyclonal (PHA) estaba disminuida en los animales deficientes en la sema7A respecto a los animales control, obteniendo valores significativos con la dosis de 50 µg, en la que se observó una menor puntuación clínica acumulada. Cuando se

estudió la producción de citocinas, identificamos que los niveles de las citocinas pro-inflamatorias IFN- γ y TNF- α estaban disminuidos en ratones sema7AKO en todos los protocolos de inmunización utilizados aunque en ninguno de ellos se alcanzaron diferencias significativas, probablemente debido a la elevada variabilidad intragrupo y al bajo número de animales incluidos en la determinación. Estos resultados relacionaría la menor capacidad proliferativa de los ratones sema7AKO con la producción reducida de citocinas pro-inflamatorias. El aumento de los niveles de IL-4 observado en los ratones sema7AKO inmunizados con la dosis de 10 μ g podría estar relacionado con el curso clínico más leve que desarrollaron estos animales. Todos estos resultados contrastan con los dos estudios precedentes (Czopik *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2007). En el primero observaron que los ratones sema7AKO presentaban mayor capacidad proliferativa así como niveles más elevados de IFN- γ en suero, lo que explicaría que en su modelo de EAE, los animales deficientes en sema7A mostraran una EAE exacerbada y obtuvieran una elevada tasa de mortalidad (Czopik *et al.*, 2006). Por el contrario, Suzuki y colaboradores describieron que la respuesta proliferativa de las células T sema7AKO era similar a la de las células de ratones control y que la producción de citocinas no estaba alterada detectando niveles de IFN- γ , IL-2 e IL-17 similares entre ambos grupos (Suzuki *et al.*, 2007). Mientras que el estudio de Czopik y colaboradores sugieren que la sema7A estaría involucrada en el control de la activación de las células T durante la respuesta inmune (Czopik *et al.*, 2006), Suzuki y colaboradores apoyan la idea de que la activación de las células inmunes se da por igual en ambos genotipos y es en la fase efectora, durante la producción de citocinas mediada por el contacto entre células T y macrófagos, donde la sema7A tendría un papel relevante en el desarrollo de la inmunidad celular (Suzuki *et al.*, 2007).

Nuestros resultados nos hacen pensar que la sema7A no es una proteína esencial para el desarrollo de la EAE. Sin embargo, hemos demostrado que está implicada en el inicio de la respuesta inmune al influir en la incidencia y en la progresión de la enfermedad según el protocolo de inmunización utilizado. Además, hemos observado que promueve la proliferación de células T antígeno específica y policlonal y que favorece la producción de citocinas pro-inflamatorias como IFN- γ

y TNF- α , probablemente mediante la interacción entre las células T y los macrófagos durante la fase efectora (Holmes *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2007). Sin embargo, hay que tener en cuenta que, aunque los animales *knockout* son una herramienta muy útil para el estudio de la función de una determinada molécula en la patogenia de las enfermedades, en algunos casos se producen mecanismos compensatorios de las vías en estudio que pueden contrarrestar, al menos parcialmente, la deficiencia de esta proteína (Bedner *et al.*, 2012; Colucci *et al.*, 1999).

Teniendo en cuenta que los ratones sema7AKO de los tres estudios tienen el mismo origen (Pasterkamp *et al.*, 2003), se podría descartar la variabilidad genética del *background* del ratón. Sin embargo, para establecer la colonia de animales fundadores en nuestro centro, los ratones sema7AKO homocigotos que nos cedió el Dr. A. Kolodkin se cruzaron entre ellos y se transfirieron los embriones a hembras gestantes SPF. Los ratones sema7AKO SPF resultantes se trasladaron a nuestro centro donde se cruzaron con ratones C57BL/6 WT SPF criados en el estabulario y así se obtuvo la F1 heterocigota que nos permitió establecer las colonias sema7AKO y WT. Todo ello, junto con unas condiciones de estabulación que pueden diferir de las de los otros grupos, puede estar introduciendo cambios que interaccionan con el alelo mutado (Hickman *et al.*, 2005; Pinto *et al.*, 2008) por lo que, a pesar de tener un origen común, no podemos asegurar que los ratones sean exactamente idénticos. En este sentido, ya se ha descrito que animales con el mismo *background* genético, procedentes de granjas de suministro comercial de animales distintas, presentan características clínicas, histopatológicas e inmunológicas diferentes tras inducir la EAE (deLuca *et al.*, 2010). Estos datos podrían justificar, al menos en parte, la discrepancia de nuestros resultados con los descritos en la literatura.

3. *Implicaciones terapéuticas en la EM*

Teniendo en cuenta los hallazgos aquí descritos junto con lo que está reportado en la literatura, podemos pensar que en el SNC las vías de señalización que median la sema3A y la sema7A poseen una función importante en la formación y resolución de las lesiones de EM contribuyendo a la maduración de la cicatriz glial, al

establecimiento de un ambiente menos permisivo para la regeneración tisular y a la remielinización, lo que influye en la capacidad para regenerar el tejido dañado y, por tanto, en el curso de la enfermedad.

En cuanto a su implicación en el sistema inmune y en la línea de lo que se ha descrito hasta el momento, hemos observado que ambas proteínas estarían implicadas en la patogenia de la EM y la EAE, tanto en la activación como en la fase efectora de la respuesta inmune, contribuyendo a los procesos inflamatorios que median, en última instancia, el daño tisular. Por ello pensamos inicialmente que ambas moléculas podrían ser dianas terapéuticas en la EM. Sin embargo, y tras los resultados obtenidos, las aproximaciones terapéuticas deberían ser específicas para cada una de las proteínas estudiadas, así como del tejido o células a las que iría dirigida. De este modo, y basándose en el aumento observado en la expresión de la sema3A y de sus receptores en las células del SNC tanto en las lesiones de EM como de EAE, una de las vías de actuación sería inhibir o reducir la presencia de la sema3A en las lesiones del SNC, ya que favorecería la regeneración axonal y la remielinización permitiendo el reclutamiento de las OPC. Sin embargo, la inhibición de la vía de señalización de la sema3A sería perjudicial si se hiciera de forma sistémica, ya que en el SNC la ausencia de la sema3A perpetuaría el contacto entre las células efectoras y las APC en la zona de inflamación mientras que a nivel de sistema inmune periférico la opción más beneficiosa sería el aumento de la expresión de la sema3A ya que limitaría la activación de las células T y, por tanto, la activación de la respuesta inmune. Por todo lo expuesto, la vía de señalización de la sema3A no sería buena diana terapéutica al no poder tratar de manera simultánea el componente neurodegenerativo y el inflamatorio.

En el caso de la sema7A como diana terapéutica, la vía de actuación sería más sencilla, ya que tanto en sistema inmune como en SNC se plantearía la reducción de los niveles de la sema7A para así reducir por un lado la formación de la cicatriz glial favoreciendo la regeneración del SNC y por el otro modular la respuesta inmune pro-inflamatoria mediada por el contacto celular entre linfocitos T y macrófagos (Figura 38). Sin embargo, el tratamiento basado en la reducción de la sema7A

tendría que combinarse con otros fármacos existentes que regulan la inflamación ya que nuestros resultados muestran que la sema7A no es una molécula esencial en la respuesta inmune en la EAE.

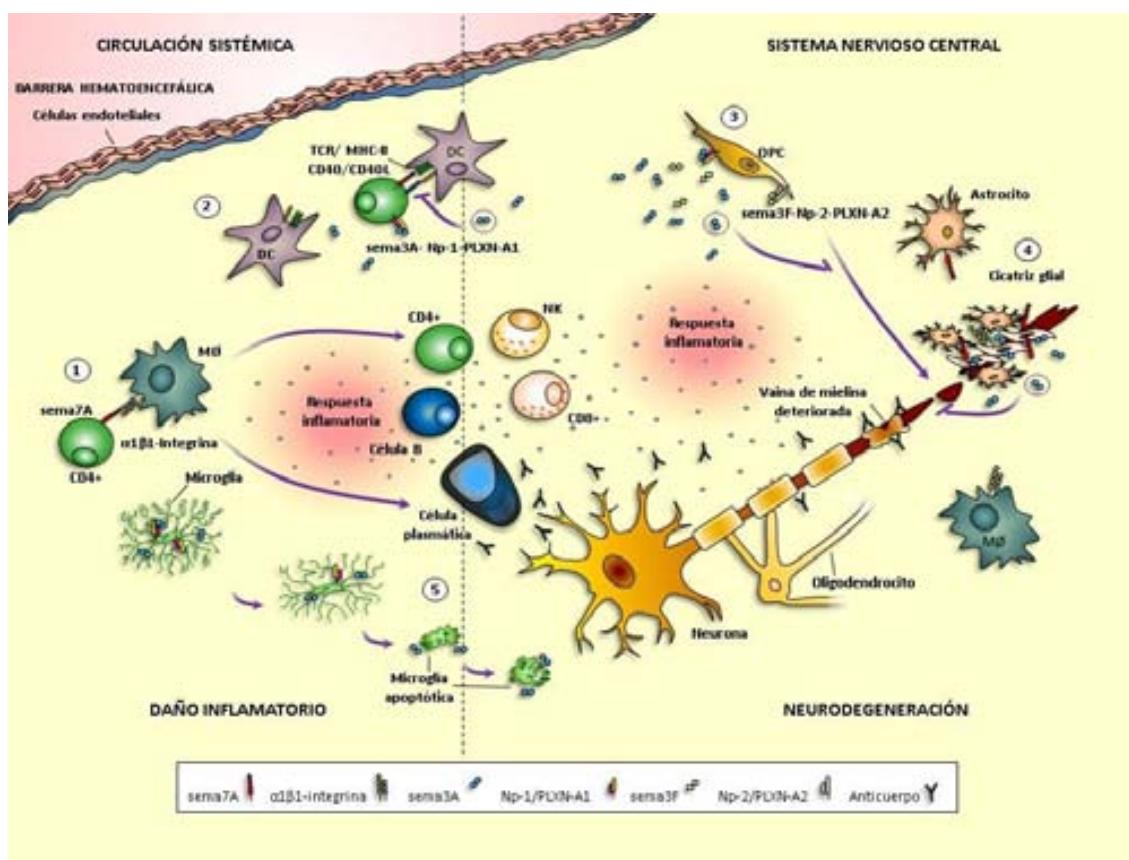


Figura 38. Funciones de la sema3A y la sema7A en la patogenia de la EM. La sema3A limitaría la activación de la respuesta inmune, mientras que la sema7A la favorecería. En el SNC, ambas estarían involucradas en la inhibición de la regeneración tisular. 1) Reclutamiento de monocitos/macrófagos al SNC mediante la interacción de la $\alpha 1\beta 1$ -integrinas de los monocitos/macrófagos con la sema7A de los linfocitos T e inicio de la respuesta autoinmune mediante la activación de otras células inmunes. 2) Finalización de la activación de los linfocitos T mediada por la interacción de la sema3A con sus receptores Np-1/PLXN-A1. 3) Inhibición de la migración y diferenciación de las OPC hacia el área lesionada a través de la vía de señalización de la sema3A. 4) Inhibición de la regeneración axonal y maduración de la cicatriz glial mediada por la presencia de la sema3A y la sema7A. 5) Inducción de apoptosis en la microglía mediante la interacción de la sema3A secretada por neuronas dañadas.

TESIS DOCTORAL

2014

Ana Gutiérrez Franco

Se maforinas 3A y 7A en la encefalitis autoinmune experimental

Función de las sémaforinas 3A y 7A en la
neurorregeneración y en la regulación de la
respuesta inmunitaria en la encefalomielitis
autoinmune experimental

Vall d'Hebron
Institut de Recerca
VHIR

IB
Universitat Autònoma
de Barcelona

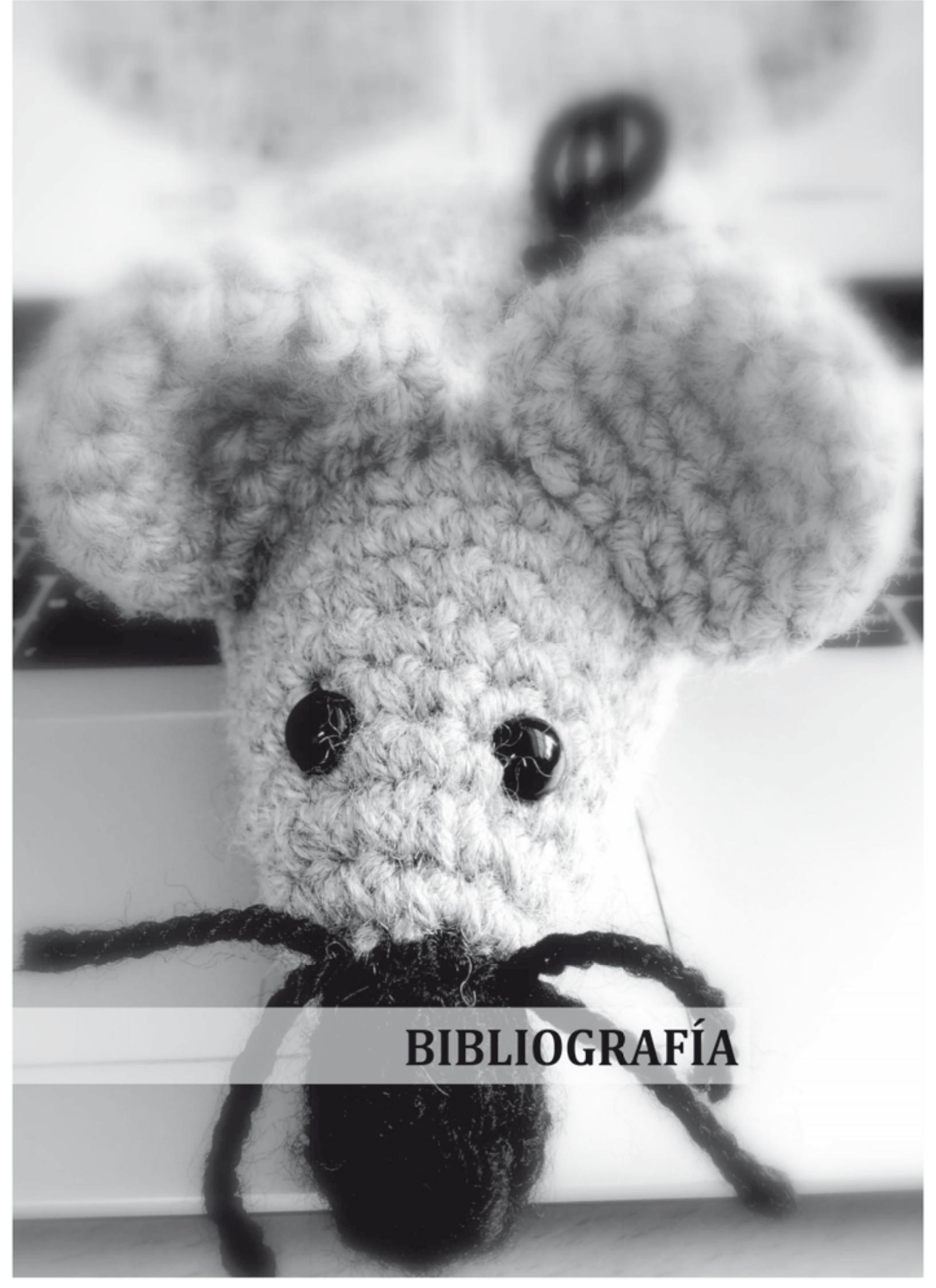
Ana Gutiérrez Franco

ASUS

CONCLUSIONES

1. En lesiones de pacientes con EM así como en el SNC de ratones con EAE, la sema3A se expresa en las neuronas, los astrocitos y en la microglía/macrófagos, mientras que su receptor, la Np-1, se expresa en la microglía/macrófagos y también en los linfocitos T y B infiltrantes en las lesiones de EAE.
2. En las lesiones de pacientes con EM, la sema7A y la α 1-integrina se expresan principalmente en los astrocitos reactivos, mientras que la β 1-integrina se expresa en los astrocitos y en la microglía/macrófagos. En el modelo de EAE, la sema7A, la α 1-integrina y la β 1-integrina están presentes en las neuronas, los astrocitos reactivos y los linfocitos T y B infiltrantes. Además, la sema7A y la α 1-integrina también se detectaron en los oligodendrocitos.
3. La expresión de la sema3A, la sema7A y de sus receptores no es exclusiva de la EM, observándose también en lesiones desmielinizantes de otras patologías del SNC como el AI y la LMP.
4. La expresión de la sema3A, la sema7A y sus receptores está asociada con el nivel de la actividad inflamatoria de las lesiones de EM y de ratones con EAE, aumentando cuanto mayor es el grado de inflamación de la lesión.
5. El aumento de la expresión de la sema3A, la sema7A y de sus receptores en lesiones de EM respecto a otras lesiones desmielinizantes del SNC sugiere que ambas vías de señalización podrían ser especialmente relevantes en la patogenia de la EM.
6. El descenso de la expresión de la sema3A y de sus receptores en las células inmunes periféricas durante el curso clínico de la EAE podría estar implicado en la perpetuación de la activación de las células T durante la fase crónica de la enfermedad.
7. El aumento de la expresión de la sema7A y la β 1-integrina en las células inmunes periféricas tras la inducción de la EAE, facilitaría la formación de un microambiente pro-inflamatorio durante la inducción de la respuesta inmune.

8. La gravedad de la EAE en los ratones sema7AKO está influenciada por la dosis de antígeno y de adyuvantes utilizados en la inducción de la enfermedad.
9. La sema7A es relevante en la respuesta inmune en la EAE ya que influye en la capacidad proliferativa de los esplenocitos, tanto antígeno específica como polyclonal.
10. La actuación farmacológica sobre la sema3A puede ser complicada debido a sus funciones en la terminación de la respuesta inmune y de la inhibición del reclutamiento y diferenciación de las OPC en las lesiones desmielinizantes en el SNC.
11. La inhibición de la sema7A podría ser una diana terapéutica en la EM ya que permitiría inhibir la respuesta autoinmune y favorecer la capacidad regenerativa del SNC.



BIBLIOGRAFÍA

- Acha-Orbea H, Mitchell DJ, Timmermann L, Wraith DC, Tausch GS, Waldor MK, et al. Limited heterogeneity of T cell receptors from lymphocytes mediating autoimmune encephalomyelitis allows specific immune intervention. *Cell* 1988; 54: 263–73.
- Adams RH, Lohrum M, Klostermann A, Betz H, Puschel AW. The chemorepulsive activity of secreted semaphorins is regulated by furin-dependent proteolytic processing. *Embo J* 1997; 16: 6077–86.
- Aharoni R, Eilam R, Domev H, Labunskay G, Sela M, Arnon R. The immunomodulator glatiramer acetate augments the expression of neurotrophic factors in brains of experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *Proc Natl Acad Sci U A* 2005; 102: 19045–50.
- Aharoni R, Eilam R, Stock A, Vainshtein A, Shezen E, Gal H, et al. Glatiramer acetate reduces Th-17 inflammation and induces regulatory T-cells in the CNS of mice with relapsing-remitting or chronic EAE. *J Neuroimmunol* 2010; 225: 100–11.
- Aharoni R, Vainshtein A, Stock A, Eilam R, From R, Shinder V, et al. Distinct pathological patterns in relapsing-remitting and chronic models of experimental autoimmune encephalomyelitis and the neuroprotective effect of glatiramer acetate. *J. Autoimmun.* 2011; 37: 228–241.
- Aharoni R. The mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and beyond. *Autoimmun Rev* 2013; 12: 543–53.
- Aladro Y, Alemany MJ, Pérez-Vieitez MC, Amela R, Conde M, Reyes MP, et al. Prevalence and incidence of multiple sclerosis in Las Palmas, Canary Islands, Spain. *Neuroepidemiology* 2005; 24: 70–75.
- Alvarez JI, Dodelet-Devillers A, Kebir H, Ifergan I, Fabre PJ, Terouz S, et al. The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science* 2011; 334: 1727–31.
- Amato MP, Portaccio E, Goretti B, Zipoli V, Battaglini M, Bartolozzi ML, et al. Association of neocortical volume changes with cognitive deterioration in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2007; 64: 1157–61.
- Angelisova P, Drbal K, Cerny J, Hilgert I, Horejsi V. Characterization of the human leukocyte GPI-anchored glycoprotein CDw108 and its relation to other similar molecules. *Immunobiology* 1999; 200: 234–45.
- Ascherio A, Munger KL, Simon KC. Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2010; 9: 599–612.
- Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol* 2007; 61: 288–99.

- Avasarala JR, Cross AH, Trotter JL. Oligoclonal band number as a marker for prognosis in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2001; 58: 2044–5.
- Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, et al. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 2000; 192: 393–404.
- Back SA, Tuohy TMF, Chen H, Wallingford N, Craig A, Struve J, et al. Hyaluronan accumulates in demyelinated lesions and inhibits oligodendrocyte progenitor maturation. *Nat. Med.* 2005; 11: 966–972.
- Bagnato F, Hametner S, Yao B, van Gelderen P, Merkle H, Cantor FK, et al. Tracking iron in multiple sclerosis: a combined imaging and histopathological study at 7 Tesla. *Brain* 2011; 134: 3602–15.
- Baker D, Amor S. Publication guidelines for refereeing and reporting on animal use in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2012; 242: 78–83.
- Barnett MH, Parratt JD, Cho ES, Prineas JW. Immunoglobulins and complement in postmortem multiple sclerosis tissue. *Ann Neurol* 2009; 65: 32–46.
- Barnett MH, Prineas JW. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann. Neurol.* 2004; 55: 458–468.
- Becker HM, Rullo J, Chen M, Ghazarian M, Bak S, Xiao H, et al. $\alpha 1\beta 1$ integrin-mediated adhesion inhibits macrophage exit from a peripheral inflammatory lesion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2013; 190: 4305–4314.
- Bedner P, Steinhäuser C, Theis M. Functional redundancy and compensation among members of gap junction protein families? *Biochim. Biophys. Acta* 2012; 1818: 1971–1984.
- Behar O, Golden JA, Mashimo H, Schoen FJ, Fishman MC. Semaphorin III is needed for normal patterning and growth of nerves, bones and heart. *Nature* 1996; 383: 525–528.
- Berard JL, Wolak K, Fournier S, David S. Characterization of relapsing-remitting and chronic forms of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Glia* 2010; 58: 434–445.
- Berger T, Rubner P, Schautzer F, Egg R, Ulmer H, Mayringer I, et al. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N. Engl. J. Med.* 2003; 349: 139–145.
- Biddison WE, Cruikshank WW, Center DM, Pelfrey CM, Taub DD, Turner RV. CD8+ myelin peptide-specific T cells can chemoattract CD4+ myelin peptide-specific T cells: importance of IFN-inducible protein 10. *J Immunol* 1998; 160: 444–8.

- Bjartmar C, Wujek JR, Trapp BD. Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. *J Neurol Sci* 2003; 206: 165–71.
- Bobolis KA, Moulds JJ, Telen MJ. Isolation of the JMH antigen on a novel phosphatidylinositol-linked human membrane protein. *Blood* 1992; 79: 1574–81.
- Bosca I, Villar LM, Coret F, Magraner MJ, Simo-Castello M, Alvarez-Cermeno JC, et al. Response to interferon in multiple sclerosis is related to lipid-specific oligoclonal IgM bands. *Mult Scler* 2010; 16: 810–5.
- Bove R, Chitnis T. The role of gender and sex hormones in determining the onset and outcome of multiple sclerosis [Internet]. *Mult Scler* 2014 Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&doct=Citation&list_uids=24561324
- Boyd A, Zhang H, Williams A. Insufficient OPC migration into demyelinated lesions is a cause of poor remyelination in MS and mouse models. *Acta Neuropathol* 2013; 125: 841–59.
- Brickshawana A, Hinson SR, Romero MF, Lucchinetti CF, Guo Y, Buttmann M, et al. Investigation of the KIR4.1 potassium channel as a putative antigen in patients with multiple sclerosis: a comparative study. *Lancet Neurol*. 2014; 13: 795–806.
- Brosius Lutz A, Barres BA. Contrasting the glial response to axon injury in the central and peripheral nervous systems. *Dev. Cell* 2014; 28: 7–17.
- Brosnan CF, Raine CS. The astrocyte in multiple sclerosis revisited. *Glia* 2012; 61: 453–65.
- Bruckner KE, el Baya A, Galla HJ, Schmidt MA. Permeabilization in a cerebral endothelial barrier model by pertussis toxin involves the PKC effector pathway and is abolished by elevated levels of cAMP. *J Cell Sci* 2003; 116: 1837–46.
- Buc M. Role of regulatory T cells in pathogenesis and biological therapy of multiple sclerosis. *Mediat. Inflamm* 2013; 2013: 963748.
- Campbell IL, Abraham CR, Masliah E, Kemper P, Inglis JD, Oldstone MB, et al. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U A* 1993; 90: 10061–5.
- Campbell IL, Hofer MJ, Pagenstecher A. Transgenic models for cytokine-induced neurological disease. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1802: 903–17.
- Catalano A, Caprari P, Moretti S, Faronato M, Tamagnone L, Procopio A. Semaphorin-3A is expressed by tumor cells and alters T-cell signal transduction and function. *Blood* 2006; 107: 3321–9.

- Catalano A. The neuroimmune semaphorin-3A reduces inflammation and progression of experimental autoimmune arthritis. *J Immunol* 2010; 185: 6373–83.
- Colucci F, Turner M, Schweighoffer E, Guy-Grand D, Di Bartolo V, Salcedo M, et al. Redundant role of the Syk protein tyrosine kinase in mouse NK cell differentiation. *J Immunol Baltim Md 1950* 1999; 163: 1769–1774.
- Comabella M, Fernandez M, Martin R, Rivera-Vallve S, Borras E, Chiva C, et al. Cerebrospinal fluid chitinase 3-like 1 levels are associated with conversion to multiple sclerosis. *Brain* 2010; 133: 1082–93.
- Comabella M, Khouri SJ. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Clin Immunol Orlando Fla* 2012; 142: 2–8.
- Comeau MR, Johnson R, DuBose RF, Petersen M, Gearing P, VandenBos T, et al. A poxvirus-encoded semaphorin induces cytokine production from monocytes and binds to a novel cellular semaphorin receptor, VESPR. *Immunity* 1998; 8: 473–82.
- Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2008; 372: 1502–17.
- Costanza M, Colombo MP, Pedotti R. Mast cells in the pathogenesis of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 15107–25.
- Craner MJ, Hains BC, Lo AC, Black JA, Waxman SG. Co-localization of sodium channel Nav1.6 and the sodium–calcium exchanger at sites of axonal injury in the spinal cord in EAE. *Brain* 2004; 127: 294–303.
- Craner MJ, Lo AC, Black JA, Waxman SG. Abnormal sodium channel distribution in optic nerve axons in a model of inflammatory demyelination. *Brain* 2003; 126: 1552–61.
- Cree BAC. 2014 multiple sclerosis therapeutic update. *The Neurohospitalist* 2014; 4: 63–65.
- Croxford JL, Olson JK, Miller SD. Epitope spreading and molecular mimicry as triggers of autoimmunity in the Theiler's virus-induced demyelinating disease model of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 2002; 1: 251–60.
- Czopik AK, Bynoe MS, Palm N, Raine CS, Medzhitov R. Semaphorin 7A is a negative regulator of T cell responses. *Immunity* 2006; 24: 591–600.
- Delaire S, Billard C, Tordjman R, Chedotal A, Elhabazi A, Bensussan A, et al. Biological activity of soluble CD100. II. Soluble CD100, similarly to H-Semall, inhibits immune cell migration. *J Immunol* 2001; 166: 4348–54.
- deLuca LES, Pikor NB, O'Leary J, Galicia-Rosas G, Ward LA, Defreitas D, et al. Substrain differences reveal novel disease-modifying gene candidates that

- alter the clinical course of a rodent model of multiple sclerosis. *J. Immunol.* Baltim. Md 1950 2010; 184: 3174–3185.
- Dutta R, Trapp BD. Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis. *Neurology* 2007; 68: S22–31; discussion S43–54.
- Duvefelt K, Anderson M, Fogdell-Hahn A, Hillert J. A NOTCH4 association with multiple sclerosis is secondary to HLA-DR*1501. *Tissue Antigens* 2004; 63: 13–20.
- Eastwood SL, Law AJ, Everall IP, Harrison PJ. The axonal chemorepellant semaphorin 3A is increased in the cerebellum in schizophrenia and may contribute to its synaptic pathology. *Mol. Psychiatry* 2003; 8: 148–155.
- Eixarch H, Espejo C, Gómez A, Mansilla MJ, Castillo M, Mildner A, et al. Tolerance induction in experimental autoimmune encephalomyelitis using non-myeloablative hematopoietic gene therapy with autoantigen. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2009; 17: 897–905.
- Eixarch H, Gutiérrez-Franco A, Montalban X, Espejo C. Semaphorins 3A and 7A: potential immune and neuroregenerative targets in multiple sclerosis. *Trends Mol. Med.* 2013; 19: 157–164.
- Eixarch H, Mansilla MJ, Costa C, Kunkel SL, Montalban X, Godessart N, et al. Inhibition of delta-like ligand 4 decreases Th1/Th17 response in a mouse model of multiple sclerosis. *Neurosci. Lett.* 2013; 541: 161–166.
- El-Behi M, Cricic B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, et al. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1– and IL-23–induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol* 2011; 12: 568–75.
- Engelhardt B, Ransohoff RM. Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood–brain barriers. *Trends Immunol* 2012; 33: 579–89.
- Espejo C, Carrasco J, Hidalgo J, Penkowa M, Garcia A, Saez-Torres I, et al. Differential expression of metallothioneins in the CNS of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience* 2001; 105: 1055–65.
- Fancy SPJ, Baranzini SE, Zhao C, Yuk D-I, Irvine K-A, Kaing S, et al. Dysregulation of the Wnt pathway inhibits timely myelination and remyelination in the mammalian CNS. *Genes Dev.* 2009; 23: 1571–1585.
- Fawcett JW. Overcoming inhibition in the damaged spinal cord. *J Neurotrauma* 2006; 23: 371–83.
- Fillatreau S, Sweenie CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* 2002; 3: 944–50.

- Fischer MT, Wimmer I, Hoftberger R, Gerlach S, Haider L, Zrzavy T, et al. Disease-specific molecular events in cortical multiple sclerosis lesions. *Brain* 2013; 136: 1799–815.
- Fissolo N, Costa C, Nurtdinov RN, Bustamante MF, Llombart V, Mansilla MJ, et al. Treatment with MOG–DNA vaccines induces CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells and up-regulates genes with neuroprotective functions in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroinflammation* 2012; 9: 139.
- Fridkis-Hareli M, Teitelbaum D, Gurevich E, Pecht I, Brautbar C, Kwon OJ, et al. Direct binding of myelin basic protein and synthetic copolymer 1 to class II major histocompatibility complex molecules on living antigen-presenting cells—specificity and promiscuity. *Proc Natl Acad Sci U A* 1994; 91: 4872–6.
- Friese MA, Fugger L. Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2009; 66: 132–41.
- Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain* 2009; 132: 1175–89.
- Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis—the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 2006; 354: 942–55.
- Frost EE, Nielsen JA, Le TQ, Armstrong RC. PDGF and FGF2 regulate oligodendrocyte progenitor responses to demyelination. *J Neurobiol* 2003; 54: 457–72.
- Fujinami RS, von Herrath MG, Christen U, Whitton JL. Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19: 80–94.
- Fukuda T, Takeda S, Xu R, Ochi H, Sunamura S, Sato T, et al. Sema3A regulates bone-mass accrual through sensory innervations. *Nature* 2013; 497: 490–493.
- Ganter P, Prince C, Esiri MM. Spinal cord axonal loss in multiple sclerosis: a post-mortem study. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1999; 25: 459–467.
- Gardinier MV, Amiguet P, Linington C, Matthieu JM. Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a unique member of the immunoglobulin superfamily. *J Neurosci Res* 1992; 33: 177–87.
- Giacobini P, Parkash J, Campagne C, Messina A, Casoni F, Vanacker C, et al. Brain endothelial cells control fertility through ovarian–steroid–dependent release of semaphorin 3A. *PLoS Biol.* 2014; 12: e1001808.
- Giger RJ, Hollis ER, Tuszyński MH. Guidance molecules in axon regeneration. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010; 2: a001867.

- Giovannoni G. Management of secondary–progressive multiple sclerosis. *CNS Drugs* 2004; 18: 653–669.
- Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain J. Neurol.* 2006; 129: 1953–1971.
- Good PF, Alapat D, Hsu A, Chu C, Perl D, Wen X, et al. A role for semaphorin 3A signaling in the degeneration of hippocampal neurons during Alzheimer’s disease. *J Neurochem* 2004; 91: 716–36.
- Gorelik L, Lerner M, Bixler S, Crossman M, Schlain B, Simon K, et al. Anti–JC virus antibodies: implications for PML risk stratification. *Ann. Neurol.* 2010; 68: 295–303.
- Goverman J, Woods A, Larson L, Weiner LP, Hood L, Zaller DM. Transgenic mice that express a myelin basic protein–specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. *Cell* 1993; 72: 551–60.
- Gran B, Zhang GX, Yu S, Li J, Chen XH, Ventura ES, et al. IL–12p35–deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL–12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *J Immunol* 2002; 169: 7104–10.
- Gutcher I, Urich E, Wolter K, Prinz M, Becher B. Interleukin 18–independent engagement of interleukin 18 receptor–alpha is required for autoimmune inflammation. *Nat Immunol* 2006; 7: 946–53.
- Hallgren B, Sourander P. The effect of age on the non–haemin iron in the human brain. *J. Neurochem.* 1958; 3: 41–51.
- Hametner S, Wimmer I, Haider L, Pfeifenbring S, Bruck W, Lassmann H. Iron and neurodegeneration in the multiple sclerosis brain. *Ann Neurol* 2013; 74: 848–61.
- Han MH, Hwang S–I, Roy DB, Lundgren DH, Price JV, Ousman SS, et al. Proteomic analysis of active multiple sclerosis lesions reveals therapeutic targets. *Nature* 2008; 451: 1076–1081.
- Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Dobson R, Giovannoni G, Ramagopalan SV. Smoking and multiple sclerosis: an updated meta–analysis. *PLoS One* 2011; 6: e16149.
- Hartung H–P, Aktas O, Menge T, Kieseier BC. Immune regulation of multiple sclerosis. *Handb. Clin. Neurol.* 2014; 122: 3–14.
- Hashimoto M, Ino H, Koda M, Murakami M, Yoshinaga K, Yamazaki M, et al. Regulation of semaphorin 3A expression in neurons of the rat spinal cord and cerebral cortex after transection injury. *Acta Neuropathol* 2004; 107: 250–6.

- Hayes CE. Vitamin D: a natural inhibitor of multiple sclerosis. *Proc Nutr Soc* 2000; 59: 531–5.
- Hemler ME. VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 1990; 8: 365–400.
- Hernandez-Pedro NY, Espinosa-Ramirez G, de la Cruz VP, Pineda B, Sotelo J. Initial immunopathogenesis of multiple sclerosis: innate immune response. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013: 413465.
- Hestvik AL, Skorstad G, Price DA, Vartdal F, Holmoy T. Multiple sclerosis: glatiramer acetate induces anti-inflammatory T cells in the cerebrospinal fluid. *Mult Scler* 2008; 14: 749–58.
- Hickman DL, Burkhart-Kasch S, Phillips TJ. The effect of fostering on the genetic expression of locomotor sensitivity to alcohol. *Comp. Med.* 2005; 55: 498–502.
- Hochmeister S, Grundtner R, Bauer J, Engelhardt B, Lyck R, Gordon G, et al. Dysferlin is a new marker for leaky brain blood vessels in multiple sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2006; 65: 855–865.
- Holmes S, Downs AM, Fosberry A, Hayes PD, Michalovich D, Murdoch P, et al. Sema7A is a potent monocyte stimulator. *Scand J Immunol* 2002; 56: 270–5.
- Holtmaat AJ, Gorter JA, De Wit J, Tolner EA, Spijker S, Giger RJ, et al. Transient downregulation of Sema3A mRNA in a rat model for temporal lobe epilepsy. A novel molecular event potentially contributing to mossy fiber sprouting. *Exp Neurol* 2003; 182: 142–50.
- Hoppenbrouwers IA, Hintzen RQ. Genetics of multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812: 194–201.
- Huber M, Heink S, Pagenstecher A, Reinhard K, Ritter J, Visekruna A, et al. IL-17A secretion by CD8+ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 2013; 123: 247–60.
- Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Ohlen C, Goverman J. A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J Exp Med* 2001; 194: 669–76.
- Imai T, Yamazaki T, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Abe T, Suzuki M, et al. Pre-target axon sorting establishes the neural map topography. *Science* 2009; 325: 585–590.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N. Engl. J. Med.* 2007; 357: 851–862.

- Ji JD, Park-Min KH, Ivashkiv LB. Expression and function of semaphorin 3A and its receptors in human monocyte-derived macrophages. *Hum Immunol* 2009; 70: 211–7.
- John GR, Shankar SL, Shafit-Zagardo B, Massimi A, Lee SC, Raine CS, et al. Multiple sclerosis: re-expression of a developmental pathway that restricts oligodendrocyte maturation. *Nat. Med.* 2002; 8: 1115–1121.
- Jones SA, Rose-John S. The role of soluble receptors in cytokine biology: the agonistic properties of the sIL-6R/IL-6 complex. *Biochim. Biophys. Acta* 2002; 1592: 251–263.
- Kalb R. The protean actions of neurotrophins and their receptors on the life and death of neurons. *Trends Neurosci.* 2005; 28: 5–11.
- Kaneko S, Iwanami A, Nakamura M, Kishino A, Kikuchi K, Shibata S, et al. A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nat Med* 2006; 12: 1380–9.
- Kang Z, Wang C, Zepp J, Wu L, Sun K, Zhao J, et al. Act1 mediates IL-17-induced EAE pathogenesis selectively in NG2+ glial cells. *Nat Neurosci* 2013; 16: 1401–8.
- Kappos L, Polman CH, Pozzilli C, Thompson A, Beckmann K, Dahlke F, et al. Final analysis of the European multicenter trial on IFNbeta-1b in secondary-progressive MS. *Neurology* 2001; 57: 1969–1975.
- Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood–brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 2007; 13: 1173–5.
- Keyser JD, Zeinstra E, Frohman E. Are astrocytes central players in the pathophysiology of multiple sclerosis? *Arch Neurol* 2003; 60: 132–6.
- Kieseier BC, Hartung HP. Interferon–beta and neuroprotection in multiple sclerosis—facts, hopes and phantasies. *Exp Neurol* 2007; 203: 1–4.
- Kim CW, Cho EH, Lee YJ, Kim YH, Hah YS, Kim DR. Disease-specific proteins from rheumatoid arthritis patients. *J. Korean Med. Sci.* 2006; 21: 478–484.
- Kleinschmidt-DeMasters BK, Miravalle A, Schowinsky J, Corboy J, Vollmer T. Update on PML and PML–IRIS occurring in multiple sclerosis patients treated with natalizumab. *J Neuropathol Exp Neurol* 2012; 71: 604–17.
- Klostermann A, Lohrum M, Adams RH, Puschel AW. The chemorepulsive activity of the axonal guidance signal semaphorin D requires dimerization. *J Biol Chem* 1998; 273: 7326–31.
- Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central

- nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2002; 169: 4712–6.
- Kolodkin AL, Matthes DJ, O'Connor TP, Patel NH, Admon A, Bentley D, et al. Fasciclin IV: sequence, expression, and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo. *Neuron* 1992; 9: 831–45.
- Kopp MA, Brommer B, Gatzemeier N, Schwab JM, Pruss H. Spinal cord injury induces differential expression of the profibrotic semaphorin 7A in the developing and mature glial scar. *Glia* 2010; 58: 1748–56.
- Kornek B, Storch MK, Weissert R, Wallstroem E, Stefferl A, Olsson T, et al. Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *Am. J. Pathol.* 2000; 157: 267–276.
- Kremer D, Aktas O, Hartung HP, Kury P. The complex world of oligodendroglial differentiation inhibitors. *Ann Neurol* 2011; 69: 602–18.
- Krumbholz M, Theil D, Steinmeyer F, Cepok S, Hemmer B, Hofbauer M, et al. CCL19 is constitutively expressed in the CNS, up-regulated in neuroinflammation, active and also inactive multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol* 2007; 190: 72–9.
- Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Brück W. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain J. Neurol.* 2002; 125: 2202–2212.
- Kumanogoh A, Marukawa S, Suzuki K, Takegahara N, Watanabe C, Ch'ng E, et al. Class IV semaphorin Sema4A enhances T-cell activation and interacts with Tim-2. *Nature* 2002; 419: 629–633.
- Kumanogoh A, Shikina T, Suzuki K, Uematsu S, Yukawa K, Kashiwamura S-I, et al. Nonredundant roles of Sema4A in the immune system: defective T cell priming and Th1/Th2 regulation in Sema4A-deficient mice. *Immunity* 2005; 22: 305–316.
- Kumanogoh A, Suzuki K, Ch'ng E, Watanabe C, Marukawa S, Takegahara N, et al. Requirement for the lymphocyte semaphorin, CD100, in the induction of antigen-specific T cells and the maturation of dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 2002; 169: 1175–1181.
- Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Bruck W, Rauschka H, Bergmann M, et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* 2005; 128: 2705–12.
- Lan RY, Ansari AA, Lian ZX, Gershwin ME. Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2005; 4: 351–63.

- Lange C, Liehr T, Goen M, Gebhart E, Fleckenstein B, Ensser A. New eukaryotic semaphorins with close homology to semaphorins of DNA viruses. *Genomics* 1998; 51: 340–50.
- Lassmann H. Mechanisms of white matter damage in multiple sclerosis [Internet]. *Glia* 2014 Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24470325
- Lenz DC, Wolf NA, Swantek RH. Strain variation in autoimmunity: attempted tolerization of DA rats results in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 1999; 163: 1763–8.
- Lepelletier Y, Lecourt S, Renand A, Arnulf B, Vanneaux V, Fermand JP, et al. Galectin-1 and semaphorin-3A are two soluble factors conferring T-cell immunosuppression to bone marrow mesenchymal stem cell. *Stem Cells Dev* 2010; 19: 1075–9.
- Lepelletier Y, Moura IC, Hadj-Slimane R, Renand A, Fiorentino S, Baude C, et al. Immunosuppressive role of semaphorin-3A on T cell proliferation is mediated by inhibition of actin cytoskeleton reorganization. *Eur J Immunol* 2006; 36: 1782–93.
- Lepelletier Y, Smaniotto S, Hadj-Slimane R, Villa-Verde DM, Nogueira AC, Dardenne M, et al. Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interactions. *Proc Natl Acad Sci U A* 2007; 104: 5545–50.
- Loeb JA. Neuroprotection and repair by neurotrophic and gliotrophic factors in multiple sclerosis. *Neurology* 2007; 68: S38–42; discussion S43–54.
- Loleit V, Biberacher V, Hemmer B. Current and Future Therapies Targeting the Immune System in Multiple Sclerosis. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2014
- Lovas G, Szilágyi N, Majtényi K, Palkovits M, Komoly S. Axonal changes in chronic demyelinated cervical spinal cord plaques. *Brain J. Neurol.* 2000; 123 (Pt 2): 308–317.
- Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology* 2014; 83: 278–286.
- Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000; 47: 707–17.
- Lumsden C. The neuropathology of multiple sclerosis. *Handb. Clin. Neurol.* 1970; 9: 217–309.

- Luo Y, Raible D, Raper JA. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 1993; 75: 217–27.
- Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* 2007; 130: 1089–104.
- Majed HH, Chandran S, Niclou SP, Nicholas RS, Wilkins A, Wing MG, et al. A novel role for Sema3A in neuroprotection from injury mediated by activated microglia. *J Neurosci* 2006; 26: 1730–8.
- Markowitz CE. Interferon–beta: mechanism of action and dosing issues. *Neurology* 2007; 68: S8–11.
- Meca–Lallana JE, Rodríguez–Hilario H, Martínez–Vidal S, Saura–Luján I, Carretón–Ballester A, Escribano–Soriano JB, et al. [Plasmapheresis: its use in multiple sclerosis and other demyelinating processes of the central nervous system. An observation study]. *Rev. Neurol.* 2003; 37: 917–926.
- Medana I, Martinic MA, Wekerle H, Neumann H. Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *Am J Pathol* 2001; 159: 809–15.
- Mendel I, Kerlero de Rosbo N, Ben–Nun A. 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* 1995; 25: 1951–9.
- Metz I, Weigand SD, Popescu BFG, Frischer JM, Parisi JE, Guo Y, et al. Pathologic heterogeneity persists in early active multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.* 2014; 75: 728–738.
- Mi S, Pepinsky RB, Cadavid D. Blocking LINGO–1 as a therapy to promote CNS repair: from concept to the clinic. *CNS Drugs* 2013; 27: 493–503.
- Miller DH, Leary SM. Primary–progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2007; 6: 903–912.
- Miller E. Multiple sclerosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012; 724: 222–238.
- Mine T, Harada K, Matsumoto T, Yamana H, Shirouzu K, Itoh K, et al. CDw108 expression during T–cell development. *Tissue Antigens* 2000; 55: 429–36.
- Miron VE, Ludwin SK, Darlington PJ, Jarjour AA, Soliven B, Kennedy TE, et al. Fingolimod (FTY720) enhances remyelination following demyelination of organotypic cerebellar slices. *Am J Pathol* 2010; 176: 2682–94.
- Mirshafiey A, Kianiaslani M. Autoantigens and autoantibodies in multiple sclerosis. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2013; 12: 292–303.

- Modrego PJ, Pina MA. Trends in prevalence and incidence of multiple sclerosis in Bajo Aragón, Spain. *J. Neurol. Sci.* 2003; 216: 89–93.
- Mohler KM, Torrance DS, Smith CA, Goodwin RG, Stremler KE, Fung VP, et al. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 1993; 151: 1548–1561.
- Montolio M, Meseguer J, Masip I, Guijarro P, Gavin R, Antonio Del Rio J, et al. A semaphorin 3A inhibitor blocks axonal chemorepulsion and enhances axon regeneration. *Chem Biol* 2009; 16: 691–701.
- Moreno B, Espejo C, Mestre L, Suardiaz M, Clemente D, de Castro F, et al. [Guidelines on the appropriate use of animal models for developing therapies in multiple sclerosis]. *Rev. Neurol.* 2012; 54: 114–124.
- Moretti S, Procopio A, Lazzarini R, Rippo MR, Testa R, Marra M, et al. Semaphorin3A signaling controls Fas (CD95)-mediated apoptosis by promoting Fas translocation into lipid rafts. *Blood* 2008; 111: 2290–9.
- Morote-Garcia JC, Napiwotzky D, Kohler D, Rosenberger P. Endothelial Semaphorin 7A promotes neutrophil migration during hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U A* 2012; 109: 14146–51.
- Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *Jama* 2006; 296: 2832–8.
- Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci* 2002; 25: 313–9.
- Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.* 2006; 1: 1559–1582.
- Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343: 938–952.
- O'Connor KC, Appel H, Bregoli L, Call ME, Catz I, Chan JA, et al. Antibodies from inflamed central nervous system tissue recognize myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Immunol* 2005; 175: 1974–82.
- O'Connor RA, Prendergast CT, Sabatos CA, Lau CW, Leech MD, Wraith DC, et al. Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2008; 181: 3750–4.
- Ohsawa S, Hamada S, Asou H, Kuida K, Uchiyama Y, Yoshida H, et al. Caspase-9 activation revealed by semaphorin 7A cleavage is independent of apoptosis in the aged olfactory bulb. *J Neurosci* 2009; 29: 11385–92.

- Oksenberg JR, Hauser SL. Mapping the human genome with newfound precision. *Ann. Neurol.* 2010; 67: A8–A10.
- Okuno T, Nakatsuji Y, Kumanogoh A. The role of immune semaphorins in multiple sclerosis. *FEBS Lett* 2011; 585: 3829–35.
- Okuno T, Nakatsuji Y, Moriya M, Takamatsu H, Nojima S, Takegahara N, et al. Roles of Sema4D–plexin–B1 interactions in the central nervous system for pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2010; 184: 1499–1506.
- Olsson Y. Mast cells in plaques of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1974; 50: 611–8.
- Otero-Romero S, Roura P, Solà J, Altimiras J, Sastre-Garriga J, Nos C, et al. Increase in the prevalence of multiple sclerosis over a 17-year period in Osona, Catalonia, Spain. *Mult. Scler. Hounds Mills Basingstoke Engl.* 2013; 19: 245–248.
- Pachner AR. Experimental models of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 2011; 24: 291–9.
- Pasterkamp RJ, Giger RJ. Semaphorin function in neural plasticity and disease. *Curr Opin Neurobiol* 2009; 19: 263–74.
- Pasterkamp RJ, Peschon JJ, Spriggs MK, Kolodkin AL. Semaphorin 7A promotes axon outgrowth through integrins and MAPKs. *Nature* 2003; 424: 398–405.
- Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, et al. Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain* 2006; 129: 3165–72.
- Perumal J, Khan O. Emerging disease-modifying therapies in multiple sclerosis. *Curr Treat Options Neurol* 2012; 14: 256–63.
- Piaton G, Aigrot MS, Williams A, Moyon S, Tepavcevic V, Moutkine I, et al. Class 3 semaphorins influence oligodendrocyte precursor recruitment and remyelination in adult central nervous system. *Brain* 2011; 134: 1156–67.
- Pinto LH, Eaton E, Chen B, Fleisher J, Shuster D, McCauley J, et al. Gene–environment interactions in a mutant mouse kindred with native airway constrictor hyperresponsiveness. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* 2008; 19: 2–14.
- Plemel JR, Manesh SB, Sparling JS, Tetzlaff W. Myelin inhibits oligodendroglial maturation and regulates oligodendrocytic transcription factor expression. *Glia* 2013; 61: 1471–1487.

- Polman CH, Matthaei I, de Groot CJ, Koetsier JC, Sminia T, Dijkstra CD. Low-dose cyclosporin A induces relapsing remitting experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Neuroimmunol* 1988; 17: 209–16.
- Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 2006; 354: 899–910.
- Pomeroy IM, Matthews PM, Frank JA, Jordan EK, Esiri MM. Demyelinated neocortical lesions in marmoset autoimmune encephalomyelitis mimic those in multiple sclerosis. *Brain J. Neurol.* 2005; 128: 2713–2721.
- Prineas JW, Kwon EE, Cho ES, Sharer LR. Continual breakdown and regeneration of myelin in progressive multiple sclerosis plaques. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1984; 436: 11–32.
- Procaccini C, Pucino V, De Rosa V, Marone G, Matarese G. Neuro-endocrine networks controlling immune system in health and disease. *Front. Immunol.* 2014; 5: 143.
- Rehman M, Tamagnone L. Semaphorins in cancer: biological mechanisms and therapeutic approaches. *Semin Cell Dev Biol* 2012; 24: 179–89.
- Revel M, Chebath J, Mangelus M, Harroch S, Moviglia GA. Antagonism of interferon beta on interferon gamma: inhibition of signal transduction in vitro and reduction of serum levels in multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 1995; 1 Suppl 1: S5–11.
- Ries S, Hilgenberg E, Lampropoulou V, Shen P, Dang VD, Wilantri S, et al. B-type suppression: a role played by ‘regulatory B cells’ or ‘regulatory plasma cells’? *Eur. J. Immunol.* 2014; 44: 1251–1257.
- Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP. Observations on Attempts to Produce Acute Disseminated Encephalomyelitis in Monkeys. *J Exp Med* 1933; 58: 39–53.
- Roitbak T, Sykova E. Diffusion barriers evoked in the rat cortex by reactive astrogliosis. *Glia* 1999; 28: 40–8.
- Roth L, Koncina E, Satkauskas S, Cremel G, Aunis D, Bagnard D. The many faces of semaphorins: from development to pathology. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 649–66.
- Scott LJ. Fingolimod: a review of its use in the management of relapsing–remitting multiple sclerosis. *CNS Drugs* 2011; 25: 673–98.
- Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 2004; 14: 164–174.

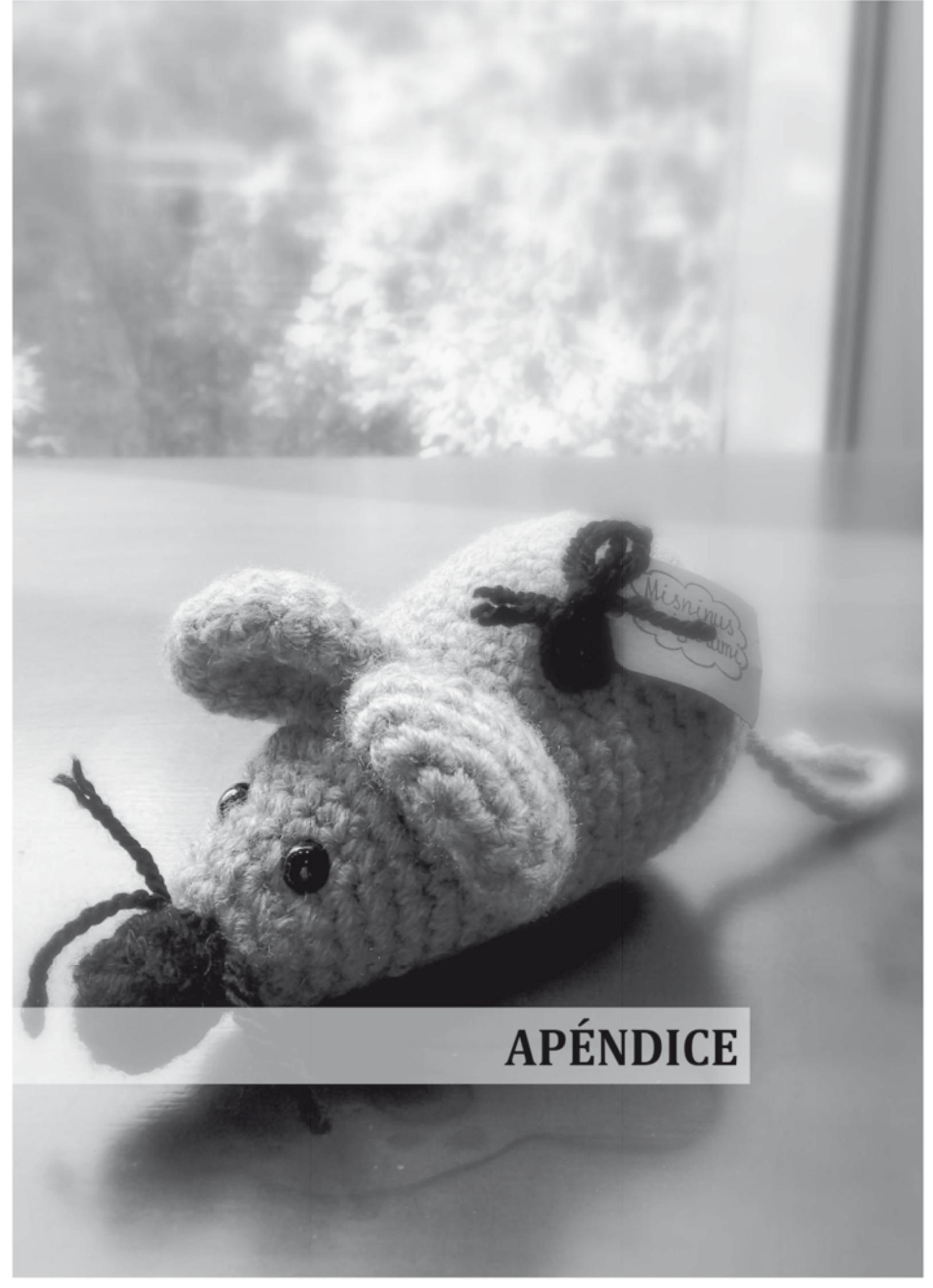
- Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 2009; 30: 636–45.
- Sibley WA, Bamford CR, Clark K. Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet* 1985; 1: 1313–5.
- Simmons SB, Pierson ER, Lee SY, Goverman JM. Modeling the heterogeneity of multiple sclerosis in animals. *Trends Immunol.* 2013; 34: 410–422.
- Sinha S, Itani FR, Karandikar NJ. Immune regulation of multiple sclerosis by CD8+ T cells. *Immunol. Res.* 2014; 59: 254–265.
- Skulina C, Schmidt S, Dornmair K, Babbe H, Roers A, Rajewsky K, et al. Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proc Natl Acad Sci U A* 2004; 101: 2428–33.
- Sloane JA, Batt C, Ma Y, Harris ZM, Trapp B, Vartanian T. Hyaluronan blocks oligodendrocyte progenitor maturation and remyelination through TLR2. *Proc Natl Acad Sci U A* 2010; 107: 11555–60.
- Smith KJ, Lassmann H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2002; 1: 232–41.
- Solomon BD, Mueller C, Chae WJ, Alabanza LM, Bynoe MS. Neuropilin-1 attenuates autoreactivity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U A* 2011; 108: 2040–5.
- Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 683–747.
- Steinman L. Elaborate interactions between the immune and nervous systems. *Nat. Immunol.* 2004; 5: 575–581.
- Stepaniak JA, Wolf NA, Sun D, Swanson RH. Interstrain variability of autoimmune encephalomyelitis in rats: multiple encephalitogenic myelin basic protein epitopes for DA rats. *J Neuroimmunol* 1997; 78: 79–85.
- Storch MK, Stefferl A, Brehm U, Weissert R, Wallstrom E, Kerschensteiner M, et al. Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol* 1998; 8: 681–94.
- Stromnes IM, Goverman JM. Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* 2006; 1: 1952–60.
- Stüve O, Marra CM, Bar-Or A, Niino M, Cravens PD, Cepok S, et al. Altered CD4+/CD8+ T-cell ratios in cerebrospinal fluid of natalizumab-treated patients with multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* 2006; 63: 1383–1387.
- Sundstrom P, Juto P, Wadell G, Hallmans G, Svenningsson A, Nystrom L, et al. An altered immune response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: a prospective study. *Neurology* 2004; 62: 2277–82.

- Suzuki K, Kumanogoh A, Kikutani H. Semaphorins and their receptors in immune cell interactions. *Nat Immunol* 2008; 9: 17–23.
- Suzuki K, Okuno T, Yamamoto M, Pasterkamp RJ, Takegahara N, Takamatsu H, et al. Semaphorin 7A initiates T-cell-mediated inflammatory responses through alpha1beta1 integrin. *Nature* 2007; 446: 680–4.
- Syed YA, Hand E, Mobius W, Zhao C, Hofer M, Nave KA, et al. Inhibition of CNS remyelination by the presence of semaphorin 3A. *J Neurosci* 2011; 31: 3719–28.
- Takagawa S, Nakamura F, Kumagai K, Nagashima Y, Goshima Y, Saito T. Decreased semaphorin3A expression correlates with disease activity and histological features of rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskelet Disord* 2013; 14: 40.
- Takahashi T, Fournier A, Nakamura F, Wang LH, Murakami Y, Kalb RG, et al. Plexin–neuropilin–1 complexes form functional semaphorin–3A receptors. *Cell* 1999; 99: 59–69.
- Takamatsu H, Kumanogoh A. Diverse roles for semaphorin–plexin signaling in the immune system. *Trends Immunol* 2012; 33: 127–35.
- Takamatsu H, Takegahara N, Nakagawa Y, Tomura M, Taniguchi M, Friedel RH, et al. Semaphorins guide the entry of dendritic cells into the lymphatics by activating myosin II. *Nat Immunol* 2010; 11: 594–600.
- Takegahara N, Takamatsu H, Toyofuku T, Tsujimura T, Okuno T, Yukawa K, et al. Plexin–A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nat. Cell Biol.* 2006; 8: 615–622.
- Tamagnone L, Artigiani S, Chen H, He Z, Ming GI, Song H, et al. Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI–anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 1999; 99: 71–80.
- Taniguchi M, Yuasa S, Fujisawa H, Naruse I, Saga S, Mishina M, et al. Disruption of semaphorin III/D gene causes severe abnormality in peripheral nerve projection. *Neuron* 1997; 19: 519–530.
- Tordjman R, Lepelletier Y, Lemarchandel V, Cambot M, Gaulard P, Hermine O, et al. A neuronal receptor, neuropilin–1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat Immunol* 2002; 3: 477–82.
- Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 1998; 338: 278–285.
- Trapp BD, Ransohoff R, Rudick R. Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Curr. Opin. Neurol.* 1999; 12: 295–302.

- Trapp BD, Stys PK. Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2009; 8: 280–91.
- Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 2008; 172: 146–55.
- Vadasz Z, Haj T, Halasz K, Rosner I, Slobodin G, Attias D, et al. Semaphorin 3A is a marker for disease activity and a potential immunoregulator in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2012; 14: R146.
- Vidal-Jordana A, Tintoré M, Tur C, Pérez-Miralles F, Auger C, Río J, et al. Significant clinical worsening after natalizumab withdrawal: Predictive factors. *Mult. Scler. J.* 2014
- Vigevano RM, Wiebenga OT, Wattjes MP, Geurts JJ, Barkhof F. Shifting imaging targets in multiple sclerosis: from inflammation to neurodegeneration. *J Magn Reson Imaging* 2012; 36: 1–19.
- Villar LM, Sadaba MC, Roldan E, Masjuan J, Gonzalez-Porque P, Villarrubia N, et al. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J Clin Invest* 2005; 115: 187–94.
- Vitale G, Mion F, Pucillo C. Regulatory B cells: evidence, developmental origin and population diversity. *Mol Immunol* 2010; 48: 1–8.
- Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* 2012; 13: 227–232.
- Waldner H, Collins M, Kuchroo VK. Activation of antigen-presenting cells by microbial products breaks self tolerance and induces autoimmune disease. *J Clin Invest* 2004; 113: 990–7.
- Wandinger K, Jabs W, Siekhaus A, Bubel S, Trillenberg P, Wagner H, et al. Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. *Neurology* 2000; 55: 178–184.
- Weber WE, Buurman WA, Vandermeeren MM, Medaer RH, Raus JC. Fine analysis of cytolytic and natural killer T lymphocytes in the CSF in multiple sclerosis and other neurologic diseases. *Neurology* 1987; 37: 419–25.
- Weinshenker BG, O'Brien PC, Petterson TM, Noseworthy JH, Lucchinetti CF, Dodick DW, et al. A randomized trial of plasma exchange in acute central nervous system inflammatory demyelinating disease. *Ann. Neurol.* 1999; 46: 878–886.
- Weissert R, Wallstrom E, Storch MK, Stefferl A, Lorentzen J, Lassmann H, et al. MHC haplotype-dependent regulation of MOG-induced EAE in rats. *J Clin Invest* 1998; 102: 1265–73.

- Wen H, Lei Y, Eun SY, Ting JP. Plexin-A4–semaphorin 3A signaling is required for Toll-like receptor– and sepsis–induced cytokine storm. *J Exp Med* 2010; 207: 2943–57.
- Williams A, Piaton G, Aigrot MS, Belhadi A, Theaudin M, Petermann F, et al. Semaphorin 3A and 3F: key players in myelin repair in multiple sclerosis? *Brain* 2007; 130: 2554–65.
- De Winter F, Oudega M, Lankhorst AJ, Hamers FP, Blits B, Ruitenberg MJ, et al. Injury–induced class 3 semaphorin expression in the rat spinal cord. *Exp Neurol* 2002; 175: 61–75.
- Wu GF, Alvarez E. The immunopathophysiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 2011; 29: 257–78.
- Xu X, Ng S, Wu ZL, Nguyen D, Homberger S, Seidel–Dugan C, et al. Human semaphorin K1 is glycosylphosphatidylinositol–linked and defines a new subfamily of viral–related semaphorins. *J Biol Chem* 1998; 273: 22428–34.
- Yadav M, Louvet C, Davini D, Gardner JM, Martinez–Llordella M, Bailey–Bucktrout S, et al. Neuropilin–1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J. Exp. Med.* 2012; 209: 1713–1722, S1–19.
- Yamada A, Kubo K, Takeshita T, Harashima N, Kawano K, Mine T, et al. Molecular cloning of a glycosylphosphatidylinositol–anchored molecule CDw108. *J Immunol* 1999; 162: 4094–100.
- Yamamoto M, Suzuki K, Okuno T, Ogata T, Takegahara N, Takamatsu H, et al. Plexin–A4 negatively regulates T lymphocyte responses. *Int Immunol* 2008; 20: 413–20.
- Zeis T, Graumann U, Reynolds R, Schaeren–Wiemers N. Normal–appearing white matter in multiple sclerosis is in a subtle balance between inflammation and neuroprotection. *Brain* 2008; 131: 288–303.
- Zeis T, Probst A, Steck AJ, Stadelmann C, Bruck W, Schaeren–Wiemers N. Molecular changes in white matter adjacent to an active demyelinating lesion in early multiple sclerosis. *Brain Pathol* 2009; 19: 459–66.
- Zhang GX, Gran B, Yu S, Li J, Siglenti I, Chen X, et al. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL–12 receptor–beta 2–deficient mice: IL–12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system. *J Immunol* 2003; 170: 2153–60.
- Del Zoppo GJ, Milner R, Mabuchi T, Hung S, Wang X, Koziol JA. Vascular matrix adhesion and the blood–brain barrier. *Biochem. Soc. Trans.* 2006; 34: 1261–1266.

- Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. Semaphorin Nomenclature Committee. *Cell* 1999; 97: 551–2.
- Multiple sclerosis: axonal loss linked to MS disability. *Nat. Rev. Neurol.* 2010; 6: 300.



APÉNDICE

Herena Eixarch, Ana Gutiérrez-Franco, Xavier Montalban and Carmen Espejo

Semaphorins 3A and 7A: potential immune and neuroregenerative targets in multiple sclerosis

Trends in Molecular Medicine, March 2013

Vol. 19, No. 3, 157–164

Semaphorins 3A and 7A: potential immune and neuroregenerative targets in multiple sclerosis

Herena Eixarch, Ana Gutiérrez-Franco, Xavier Montalban, and Carmen Espejo

Servei de Neurologia-Neuroimmunologia, Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya (Cemcat), Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Ps. Vall d'Hebron, 119-129, 08035 Barcelona, Spain

Semaphorins have been classically defined as axonal signalling cues involved in central nervous system (CNS) development, but in adults these molecules are expressed in distinct tissues and exert various functions under several physiological and pathological contexts. Semaphorins capable of modulating the immune system are particularly relevant in autoimmune diseases, especially multiple sclerosis (MS), which is a demyelinating, neurodegenerative disease. In this article, we compile recent insights into the specific roles of semaphorin (sema)3A and sema7A to clarify the details of their possible participation in the inflammatory and neurodegenerative phases of MS.

Semaphorins and their receptors

Semaphorins were first described in the 1990s as axon guidance molecules (see Glossary) that can act as bifunctional signalling molecules to provide chemorepellent or chemoattractant cues in the nervous system. Their role during nervous system development has been widely studied, but semaphorins are also expressed after early neural development and are involved in the subsequent establishment of a fully functional adult central nervous system (CNS) [1]. Many semaphorin subclasses are expressed in adult tissues other than the nervous system, and these proteins play important roles in various physiological and pathological processes involving the immune system, organogenesis, and vascularisation (reviewed in [2]). Semaphorins may also play important roles in certain cancers, acting to either suppress or promote tumours [3].

As many as 20 semaphorins have been described [4], and these are divided into eight classes with each class further divided into distinct subclasses designated by letters. Classes 1 and 2 are expressed only in invertebrates; classes 3, 4, 6, and 7 are found exclusively in vertebrates; class 5 is expressed in both vertebrates and invertebrates; and class V consists of viral semaphorins [5].

All semaphorins have an extracellular amino terminal domain approximately 500 amino acids in length, referred to as the sema domain. Depending on the subclass, semaphorins contain specific additional sequence motifs in the C terminus, including immunoglobulin (Ig)-like and type-1

thrombospondin domains. In addition, semaphorins differ from one another with respect to membrane anchorage; type-1 transmembrane, glycosylphosphatidylinositol

Glossary

Adaptive immunity: this type of immunity is mediated by B or T cells and involves the resolution or prevention of a pathogenic attack. Adaptive immune responses are antigen specific and generate protective immunity by generating memory B or T cells. As a consequence, stronger responses are mounted if the cells of the adaptive immune system recognise the same pathogen on subsequent occasions.

Autoimmune diseases: these diseases are caused by an abnormal and pathological condition that is characterised by the presence of T and/or B cells that specifically target self antigens, or antigens created from the body's own tissues.

Axon guidance molecules: these molecules guide axons in neural development until they reach their final target. Axon guidance molecules can exert attractive or repulsive effects. Some examples of axon guidance molecules are semaphorins, ephrins, netrins, and slits.

Clinically isolated syndrome (CIS): this term is used to describe a first clinical event compatible with MS, with at least a duration of 24 h. The clinical manifestations are caused by inflammation or demyelination in one (monofocal) or more sites (multifocal) into the central nervous system. Although MS experts use this term, there is not a uniform consensus definition yet.

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): is the predominant animal model for MS given that it reproduces many of the clinical and histopathological features of the human disease. EAE is induced by injecting components of the myelin sheath, most commonly myelin proteins [myelin basic protein (MBP), myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), and proteolipid protein (PLP)], into susceptible animals (including rodents and primates) together with an adjuvant. EAE can also be induced by the passive transfer of myelin antigen reactivated T cells.

Innate immunity: this type of immunity is driven by nonspecific cells of the innate immune system (i.e., macrophages, neutrophils, basophils, eosinophils, and DCs). The innate immune system is the body's first line of defence and does not generate protective immunity but rather triggers the activation of the cells of the adaptive immune system.

Neurodegeneration: refers to the degeneration of either the neuron itself or the axon. Neurodegeneration leads to the loss of neural function and eventually the death of the neuron.

Oligodendrocyte precursor cells: highly proliferative and migratory bipolar cells that differentiate into pro-oligodendrocytes and can sometimes differentiate into neurons and astrocytes. Pro-oligodendrocytes further differentiate into oligodendrocytes, expressing myelin proteins such as MBP, PLP, or myelin-associated glycoprotein (MAG). The absence or reduction in the number of oligodendrocytes progenitor cells leads to a deficiency in differentiated oligodendrocytes that is associated with an inadequate myelination, and as a consequence impaired neuronal function can occur.

Thrombospondin type-1 domain: this functional domain was primarily described in the thrombospondin protein, in which it is repeated three times, although it is present in other families of proteins. Each thrombospondin type-1 repeat (TSR) is a domain composed of three antiparallel strands that form a positively charged region, which binds with high affinity to the negative regions of its binding partner. The thrombospondin type-1 domain has been involved in various biological events such as cell-cell interactions, the inhibition of angiogenesis and apoptosis.

Corresponding author: Espejo, C. (carmen.espejo@vhir.org).

Keywords: semaphorin; neurodegeneration; neuroregeneration; immunomodulation; multiple sclerosis; experimental autoimmune encephalomyelitis.

(GPI)-anchored, and secreted semaphorins have all been identified. Semaphorins that belong to classes 1, 4, 5, and 6 are transmembrane proteins, whereas semaphorin (sema)7A is a GPI-anchored molecule. Class 2 and 3 semaphorins are secreted molecules.

Plexins are the primary receptors for semaphorins, and are subdivided into four groups (A–D). Plexins are not only ligand-binding proteins but are also signalling receptors for semaphorins, which bind directly to plexins, with the exception of class 3 semaphorins, which bind to neuropilins (Nps) and signal through plexins. Sema3E is the only

Box 1. Aetiology and immunopathogenesis of multiple sclerosis

Although the complete aetiology of MS has yet to be elucidated, it appears clear that the immune system plays a relevant role in the initial phase of this condition. Major histocompatibility complex type II (MHC II) subtypes HLA-DR and DQ are risk factors for MS, and many immune genes are differentially expressed in patients with MS. CNS-related genes, such as Notch-4 and MBP, have also been associated with MS [51,52]. In addition, environmental factors, such as sunlight exposure, lifestyle, or infections have been suggested to contribute to the initiation of MS. Owing to the involvement of the immune system in the pathogenesis of the disease, infectious agents are considered plausible candidates for MS initiation, which is supported by the fact that mice expressing a transgenic TCR specific for an MBP peptide only develop spontaneous EAE when maintained in a non-pathogen-free environment [53]. Molecular mimicry and/or bystander activation of immune reactive cells are mechanisms proposed to explain how infectious agents may trigger MS [51].

In 1933, Rivers induced a condition that was similar to MS by injecting CNS homogenates in healthy primates. These observations lead to the hypothesis of an autoimmune origin of the disease [54]. EAE is the animal model for MS. It is an induced model that eventually leads to an inflammatory and demyelinating disease. EAE models mimic some, but not all, aspects of the immune-mediated damage in the CNS in MS. Like MS, EAE is a heterogeneous disease influenced by genetic features of the selected species as well as the selected autoantigen. Despite the great benefits of EAE models for studying MS pathogenesis and obtaining proof-of-concept for new therapeutic strategies, this animal model has been criticised mainly for the large number of potential treatments that improved clinical and histopathological signs of EAE but failed to demonstrate clinical efficacy in MS patients. In addition, although EAE is considered a CD4⁺ T cell-mediated disease, CD8⁺ T cells are predominant in MS lesions, and the lack of EAE models that mimic the primary progressive courses of the human disease limits the understanding of that subtype [55]. The data that have been obtained from the EAE model as well as the composition of the infiltrates present in the CNS of patients with MS clearly indicate that CD4⁺ T cells play a major role in the pathogenesis of the disease. In fact, patients with MS present myelin-specific CD4⁺ T cells that most likely have a T helper 1 (Th1) or Th17 phenotype, and which are crucial in disease initiation. Nevertheless, other immune populations are involved. CD8⁺ T cells seem to play a major role in the injury of the CNS rather than in the initiation of the immune response, and B lymphocytes and innate immune system cells also contribute to MS pathogenesis [56]. Although the involvement of humoral responses in MS pathogenesis remains controversial, they appear to play a role in determining the outcome of the disease. The majority of patients with MS (and more than 95% of Caucasian patients) present IgG oligoclonal bands in the CSF, and a high percentage of these patients also exhibit IgM oligoclonal bands. Oligoclonal IgM antibodies against myelin lipids in the CSF of patients with MS predict a more aggressive course of the disease [57]. Nevertheless, the specific role of antibodies in MS/EAE is still unclear.

member of the sema3 subclass that functions without binding to Nps. Plexin (PLXN)-C1 has been identified as the sema7A receptor [6,7], but the principal signalling function of this semaphorin in the nervous and immune systems is mediated through integrins [8,9]. Semaphorins use several other receptors, including proteoglycans, cell adhesion molecules, T cell immunoglobulin domain and mucin domain 2 (TIM-2), CD72, Ron, Met, off-track (OTK), and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) [10,11]. The diversity of biological functions that are performed by semaphorins in different tissues may in turn rely on the diversity of the receptor complexes. For instance, sema3A is known to signal through PLXN-A1, but experimental evidence indicates that this molecule can also signal through PLXN-A4 in different contexts.

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory and demyelinating disease of the CNS. It is considered an autoimmune disease because patients with MS have reactive T cells that recognise myelin antigens (Box 1). MS is the second leading cause of disability in young adults following trauma, which has a significant socioeconomic impact. MS results in severe physical disability due to neurodegeneration caused by immune system targeting of myelin components. The inflammatory phase of the disease has been widely studied, and, consequently, all of the currently available treatments aim to modulate pathogenic autoimmune responses. Nevertheless, little is known regarding the biological molecules involved in the neurodegenerative process (Box 2), and no therapies have been developed to modulate the balance between degeneration and regeneration in neurons. The emerging data regarding the role of various semaphorins in the regulation of immune responses are promising for future MS therapies because targeting these molecules could address both the inflammatory and neurodegenerative processes that characterise this chronic and disabling disease. In this opinion article, we discuss how sema3A and sema7A are relevant to both the immune response and the CNS in the pathogenesis of MS, a condition in which the CNS and immune system strongly interact.

Many semaphorins are expressed by a variety of immune cells and have an identified function modulating the immune responses. The first semaphorin to be identified with an immunoregulatory role was sema4D, although others have subsequently been described as having prominent roles in regulating immune responses (reviewed in [11,12]). Sema3A and sema7A are expressed in the immune system but are less well-studied in the context of MS. The existing data on their function in immunity and in the adult CNS indicate a relevant role for sema3A and sema7A in the pathogenesis of MS, and in our opinion make them interesting candidates as new therapeutic targets for this disease.

Sema3A and sema7A in the immune system

Sema3A was the first semaphorin to be identified in vertebrates [13] and is the only secreted immune semaphorin in this phylum. In vertebrates, sema3A primarily functions to repel axons in the developing nervous system. It is secreted as a 95-kDa homodimer that can be cleaved into a 65-kDa monodimeric form that exhibits reduced repulsive activity

Box 2. The neuropathology of multiple sclerosis

The data that have been obtained from the animal model of MS suggest that alterations in the CNS, in addition to the immune system, are involved in MS development, progression, and the failure of CNS repair. Astrocytes form glial scars that eventually impede CNS repair, and these glial cells have been suggested to play roles as APCs, which could initiate the inflammatory events that occur in the CNS of MS patients [58]. The major histopathological findings of MS include immune-mediated oligodendrocyte death, reactive gliosis, and axon loss, amongst others.

The CNS has intrinsic regenerative capacities, including the ability, albeit limited, to remyelinate. Although the failure of remyelination in patients with MS is poorly understood, it has been suggested that (i) oligodendrocyte precursor cells may be destroyed or (ii) the pool of these precursor cells is exhausted or incapable of differentiating into mature oligodendrocytes. In either of these situations, the CNS would be unable to generate new myelinating cells. Other factors that could contribute to remyelination failure are the secretion of inhibitory molecules by reactive astrocytes from the glial scar or the lack of axonal signalling [59]. Axon loss is the major cause of disability in MS and is speculated to be one of the events that contribute to disease progression. Axon transection occurs early in MS, indicating that axonal damage does not only occur as a consequence of the inflammatory process in the late stages of MS. Most likely, the inflammatory mediators that are released by the cells of the immune system into the CNS damage axons non-specifically, rather than axons being specifically targeted. Alternatively, the lack of trophic support from oligodendrocytes may contribute substantially to the degeneration of chronic demyelinated axons. The compensatory mechanisms that occur in the axon to restore the conduction of the nerve impulse following demyelination ultimately lead to calcium-mediated axonal injury in MS [60].

[14,15]. A variety of mature and differentiating immune cells express sema3A, which participates in (i) cell migration processes, (ii) modulation of immune responses, and (iii) apoptosis induction in both leukaemic cells and monocyte-derived macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)-differentiated macrophages [16–19]. The sema3A produced by lymphatic endothelial cells plays a pivotal role in the migration of dendritic cells (DCs) into the lymph nodes due to its interaction with the PLXN-A1/Np-1 receptor complex, which is expressed on the trailing end of migrating DCs [20]. These findings indicate that the defective T cell priming observed in *plxn-A1*-deficient mice is primarily due to the inability of DCs to properly migrate into the lymph nodes.

Several studies have demonstrated the direct immunomodulatory potential of sema3A in various contexts. Tumour cell-secreted sema3A may contribute to the T cell dysfunction that is observed in the tumour microenvironment, as well as to the capacity of these cells to produce cytokines by inhibiting T cell activation [21]. Sema3A homodimers are expressed by activated T cells and by inflammatory cytokine-activated DCs. However, the *in vitro* maturation of DCs via the CD40/CD40L pathway results in the production of the monodimeric 65-kDa sema3A isoform, which can antagonise the active 95-kDa homodimer [19]. Np-1, the functional receptor for sema3A in T cells [19,21], is coexpressed by resting T cells and DCs and participates in the formation of immune synapses via homotypic interactions. Thus, Np-1 is critical for initiating the primary immune response [22]. Sema3A does not inhibit immune synapse formation by interfering with this homotypic interaction but rather modulates T cell

responses by blocking actin cytoskeleton reorganisation. This inhibition impairs the redistribution of T cell receptors (TCRs) in the DC/T cell contact zone and inhibits TCR-mediated T cell activation signals [19], most likely via PLXN-A4-mediated signalling [23]. However, the secretion of sema3A by activated T cells during the immune response is delayed, suggesting that sema3A/Np-1 interactions participate in terminating the immune response, thus restraining overactivation. In fact, sema3A expression has also been observed in mesenchymal stem cells, providing a plausible explanation for their well-known immunosuppressive capabilities [24]. Regardless of the suppressive function that sema3A exerts in adaptive immune responses, this protein has also been reported to promote innate immunity through interactions with PLXN-A4 [25]. Table 1 summarises the roles of sema3A and sema7A in both the CNS and the immune system.

Sema7A is a GPI-anchored membrane protein that has a high degree of homology to viral semaphorins encoded by the vaccinia virus and herpesvirus [6,26,27]; sema7A may also exist as a cleaved soluble form [8,28]. In the immune system, sema7A is preferentially expressed by activated lymphocytes [29], but sema7A mRNA has also been detected in monocytes [30]. Furthermore, sema7A in the haematopoietic system is the antigen in erythrocytes that defines the very common John Milton Hagen (JMH) human blood group antigen [31]. The JMH antigen has been linked to a benign autoimmune disorder, suggesting a possible role for this protein in autoimmune diseases. Although PLXN-C1 has been demonstrated to be a sema7A binding partner [6,7], the effect of this class 7 semaphorin on the immune system is mediated by its binding to $\alpha 1\beta 1$ -integrin [9]. Sema7A plays a critical role in the effector phase of T cell-mediated immune responses and acts as a chemoattractant signal for monocytes and macrophages *in vitro*. Sema7A also functions as an effector molecule, inducing proinflammatory cytokine production and the release of superoxide from monocytes, macrophages, and, to a lesser extent, neutrophils [9,30]. Likewise, sema7A is expressed by activated CD4 $^{+}$ T cells and accumulates at the contact zone between T cells and macrophages, inducing both the clustering of $\alpha 1\beta 1$ -integrins and the formation of focal adhesion complexes in monocytes and macrophages [9]. All of these findings indicate that sema7A is an important component of the immune synapse that has a relevant role in T cell-mediated immunity. In addition, endothelial sema7A has a key role in the transmigration of immune cells under hypoxic conditions, via PLXN-C1 signalling [32].

Sema3A and sema7A in the adult CNS

In the adult nervous system, sema3A is expressed by neurons of both the peripheral nervous system (PNS) and the CNS. In certain contexts, the role of sema3A is related to that of sema3F. In the context of injury, the PNS and CNS experience differing levels of axonal regeneration; only peripheral nerve axons can regenerate, whereas injury to CNS axons leads to permanent impairment. In the latter case, the establishment of a non-permissive environment prevents nerve regeneration. In models of spinal cord transection, the pattern of sema3A expression

Table 1. The roles of sema3A and sema7A in both the CNS and immune system

	Central nervous system	Refs	Immune system	Refs
Sema3A	Interrupts the entry of regenerating axons into the glial scar	[34,35]	Enhances DC migration into lymph nodes	[20]
	Inhibits OPC migration	[37]	Induces apoptosis in M-CSF-derived macrophages	[17]
	Induces apoptosis in microglia due to neuronal stress in an inflammatory context	[38]	Terminates the immune response	[24]
Sema7A	Maturation of the glial scar	[28]	Chemoattractant signal for monocytes and macrophages	[9]
			Induces the production and release of proinflammatory cytokines by monocytes and macrophages	[9,30]
			Defines the John Milton Hagen human blood group	[31]

Abbreviations: DC, dendritic cell; OPC, oligodendrocyte precursor cell; CSF, cerebral spinal fluid.

by neurons is altered upon axonal damage [33], and the combination of sema3A release by the neural scar and the expression of its receptor complex in the injured neurons inhibits the ability of regenerating axons to enter the scar tissue [34,35]. Furthermore, it has been observed that blocking the activity of sema3A promotes axon regeneration [36]. All of these findings support the suggestion that sema3A has inhibitory and/or repulsive roles in the adult CNS.

Functions other than axon guidance have been attributed to sema3A, which as a soluble semaphorin also limits the migration of oligodendrocyte precursor cells (OPCs) into the adult CNS, in contrast to the role of sema3F, which attracts OPCs [37]. Sema3A also exerts a neuroprotective effect by inducing microglia apoptosis upon neuronal stress via interactions with Np1/PLXN-A1 in an inflammatory context [38], a function that is consistent with the proapoptotic effect of sema3A in human monocyte-derived macrophages [18]. In addition, sema3A may be involved in neurological disorders such as epilepsy [39] and Alzheimer's disease [40], as well as in patients with schizophrenia [41], suggesting a possible role for this molecule in the development of various neurological diseases.

During development, sema7A principally acts as a chemoattractant cue for axonal growth cones. In adults this protein is expressed in different tissues, such as the nervous system, lymphoid tissues, the testis, and the lung [29,42]. In the CNS, sema7A binds to β 1-integrins and signals through mitogen-activated protein kinases (MAPKs) [8,9]. Although PLXN-C1–sema7A interactions seem to be involved in neuronal network formation, in the adult CNS both of these proteins may function separately [43]. Sema7A is expressed in different neuronal and glial cells in both the healthy and regenerating CNS [8,27,28], and it is involved in the maturation of the glial scar following spinal cord injury. Sema7A is expressed in injured neurons immediately following the induction of a lesion, and its expression is upregulated in reactive astrocytes surrounding the glial scar. This temporal expression pattern matches the time course of tissue remodelling [28]. The existing data regarding sema7A highlights the need to study its roles in the adult nervous system in greater depth.

Sema3A, sema7A, and their putative role in MS

It is known that a variety of semaphorins with a described function in the immune system are important in the pathogenesis of MS (reviewed in [44]). Sema3A and sema7A may be particularly relevant in the context of MS given

that both of these molecules are involved in immune regulation, neurodegeneration, and, possibly, neuroprotection. This latter process may be deregulated in MS, most likely contributing to the disabilities observed in patients with this condition.

Sema3A in MS

Sema3A may be a promising target for treating autoimmune diseases. In some autoimmune disorders the role of sema3A seems very clear: CD4 $^{+}$ T cells derived from patients with rheumatoid arthritis (RA) lack sema3A expression, and the overexpression of sema3A partially prevents and ameliorates the progression of collagen-induced arthritis (CIA), the animal model of RA [45]. However, in the pathogenesis of MS both the immune and the nervous systems are involved. Sema3A seems to have a positive role in the immune system because it terminates the immune response. By contrast, it has a mainly detrimental effect in the CNS because of its inhibitory capacity on OPC migration towards the site of lesion, or the repulsive activity that impedes the outgrowth of injured neurons. This makes it complicated to elucidate whether changes in sema3A expression would have a beneficial or a damaging effect on MS outcome. In the context of the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS, mice deficient in *plxn-A4* show a worse clinical course of the disease, most likely because of the hyperactivation of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-specific T cells [23], and the authors of this study propose that the sema3A/Np-1/PLXN-A4 pathway is involved in EAE pathogenesis. These data are in line with studies which demonstrate that mice receiving CD4 $^{+}$ T cells overexpressing Np-1 are highly resistant to EAE development. In addition, the clinical course of EAE worsens in CD4 $^{+}$ T cell *np1*-deficient mice. One of the mechanisms the authors suggest is the involvement of sema3A/Np-1/PLXN-As in limiting the interaction between the T cell and the APC in the immune response [46].

Sema3A may also participate in myelin repair processes in MS. *Sema3A* and *sema3F* transcripts are upregulated in grey matter neurons, astrocytes, and the microglial cells that surround or reside in active inflammatory lesions, both in patients with MS and in an experimental model of demyelination [47]. Piaton and colleagues defined the functional role of sema3A in remyelination in the adult CNS, and showed that sema3A and sema3F have opposite roles in regulating the recruitment of adult OPCs to CNS

lesions in a toxin-induced demyelination model [37]. The expression levels of *sema3F* and its receptor *Np-2* increase following demyelination, driving the recruitment of OPCs towards the lesion. Likewise, the overexpression of *sema3F* correlates with enhanced early remyelination and thus with accelerated myelin repair. By contrast, the expression of *sema3A* and *Np-1* is delayed and associated with a decrease in remyelinating precursor cell recruitment, suggesting that *sema3A* may act as a stop signal for OPC recruitment after a sufficient number of remyelinating precursor cells have been attracted to the lesion by *sema3F* [37]. Consistently, other studies have identified an inhibitory role for *sema3A* in remyelinating processes [48], showing a reversible block of OPC differentiation in the presence of *sema3A*. Although some remyelination occurs in MS, these observations reinforce the idea that deregulated expression of *sema3A* and *sema3F* in the CNS may be important factors underlying impaired OPC recruitment and/or differentiation in MS lesions, an effect that would ultimately limit myelin repair.

Thus, when considering *sema3A* as a possible target for MS treatment, the dual roles of this molecule must be considered. A treatment focused on the upregulation of *sema3A* expression may favour resolution of the inflammatory process and would promote the apoptotic effect on activated microglia, which could have substantial beneficial effects for MS patients. On the contrary, a downregulation in *sema3A* expression or function would be desired in the context of CNS repair. In addition, the inhibition of *sema3A* specifically into the CNS would promote the migration of OPCs to the demyelinated areas, facilitating the remyelination processes that in the end would restore neuronal function in patients suffering from MS. In fact, an intervention in terms of enhancing neuroregeneration would probably give a therapeutic option to those patients with progressive forms of the disease. When considering *sema3A* as a therapeutic target, it is necessary to explore new approaches specifically targeting the tissue or the cell type of interest in which *sema3A* should be modulated.

Sema7A in MS

Sema7A has not been studied as widely in the context of either autoimmune or neurological diseases. However, a recent study reported diminished *sema7A* levels in the cerebrospinal fluid (CSF) of patients with clinically isolated syndrome (CIS) who subsequently converted to MS. The fact that *sema7A* is found in the CSF of patients that finally developed MS suggests that a cleaved form of the protein has a biological significance that remains to be solved. Patients converting to clinically definite MS would have more GPI-anchored *sema7A*, thus promoting the proinflammatory events involving cell–cell contact between autoreactive T cells and macrophages within the CNS. All of these data suggest that *sema7A* may participate in the pathogenesis and progression of MS [49]. This statement is supported by two studies that investigated the role of *sema7A* in EAE. Czopik and collaborators demonstrated that *sema7A* is a negative regulator of T cell-mediated responses [50]; *sema7A*-deficient T cells were hyperactive upon stimulation both *in vitro* and *in vivo*. The authors reported a more severe course of MOG-induced

EAE and a greater mortality rate among *sema7A*-deficient mice. By contrast, wild type (WT) littermates and surviving *sema7A*-deficient animals displayed similar clinical scores. In addition, *sema7A*-deficient mice had a larger number of lymphocytes infiltrating the CNS as well as elevated levels of proinflammatory cytokines. These cytokines and T cell hyperactivation are proposed to be responsible for the high mortality rates observed for these mice. Nevertheless, the authors could not describe a specific function for *sema7A* in the CNS as either a pro-survival or neuroprotective factor in the context of EAE.

By contrast, Suzuki and colleagues [9] described *sema7A* as a critical molecule in the effector phase of the T cell immune response. These authors demonstrated that *sema7A*-deficient mice developed milder EAE with fewer infiltrates in the CNS. After transferring *sema7A*-defective T cells from MOG-immunised mice to WT littermates, EAE development was less severe in the latter group. Because of the conflicting results of these studies, the involvement of *sema7A* in both the inflammatory and neurodegenerative phases of EAE and MS must be studied further.

Concluding remarks and future perspectives

Considerable progress has been made in the study of *sema3A* and *sema7A* in the developing CNS, but it remains necessary to further explore the biological activities of these molecules, particularly their poorly understood roles in the adult CNS under normal physiological conditions, as well as autoimmune or neurodegenerative contexts.

Current MS therapies are designed to treat the inflammatory phase of the disease and, thus, are not applicable to patients with progressive forms of MS, for which there are currently no therapeutic options. Because demyelination may be the most important cause of axonal damage, and because axonal damage appears to play an important role in MS pathogenesis, it is important to both investigate and further develop strategies that enhance remyelination and axonal protection. If these goals are met, neuroprotection could be enhanced and neuroregeneration promoted. In this sense, *sema3A* and *sema7A* are extremely attractive therapeutic targets, given that both the inflammatory and neurodegenerative processes could be modified with a single intervention. However, it may be necessary to restrict the modification of *sema3A* function to favour OPC recruitment by downregulating its expression or specifically blocking *Np-1* in this cell type. The contradictory findings of Czopik *et al.* [50] and Suzuki *et al.* [9] provide evidence that *sema7A* likely participates in MS pathogenesis and may constitute a novel therapeutic target for disease treatment. In addition, a diagnostic role for *sema7A* as a biomarker could be considered, given that diminished levels of this protein have been reported in the CSF of patients who converted to clinically definite MS [49].

In Figure 1, we propose a model that defines the distinct roles of *sema3A* and *sema7A* in both the inflammatory and neurodegenerative components of MS pathogenesis in the CNS. We hypothesise that *sema7A* recruits monocytes and macrophages to the CNS and may help initiate the autoimmune response by challenging the activation of other

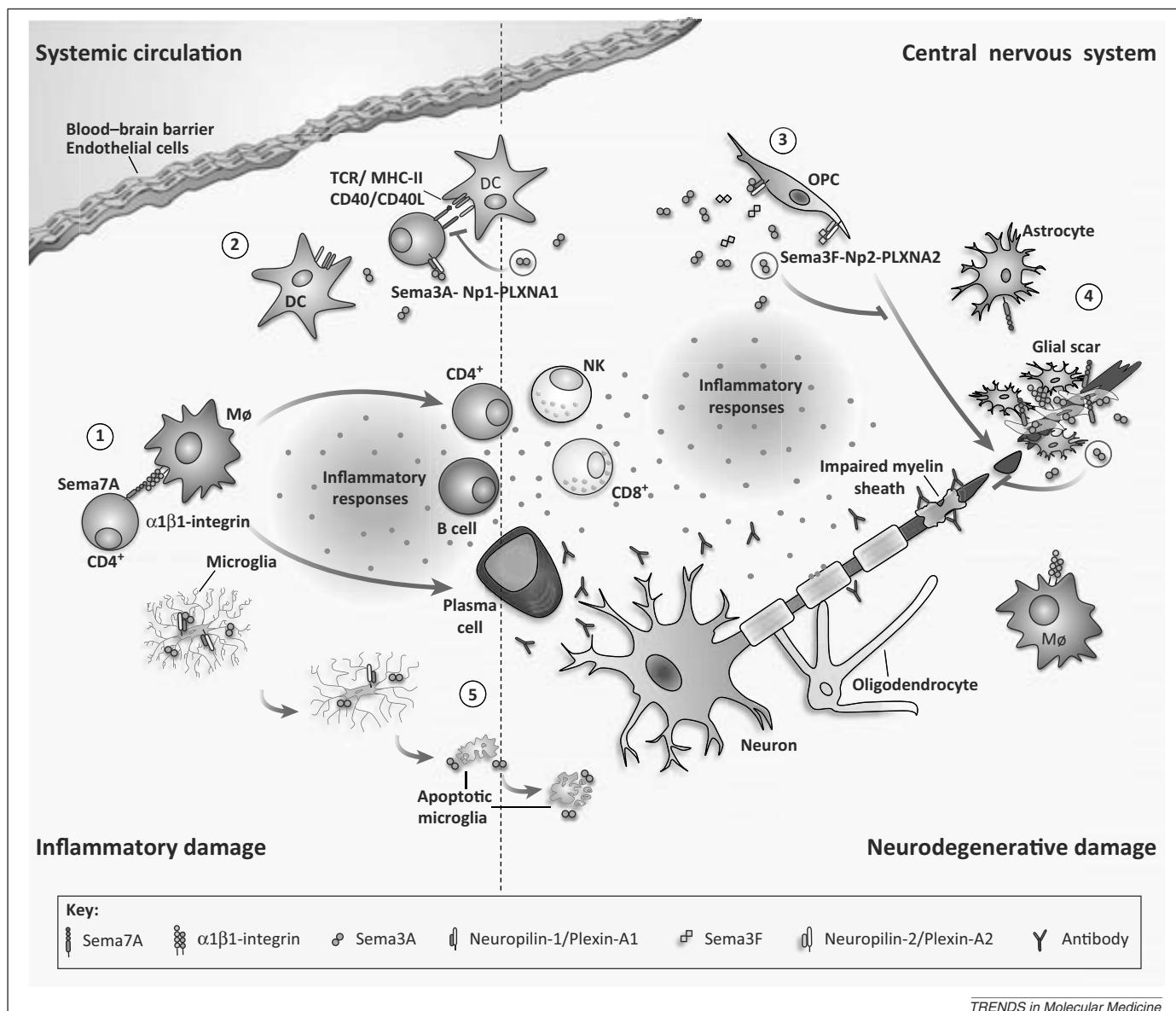


Figure 1. A model of sema3A and sema7A involvement in multiple sclerosis (MS) pathogenesis. Genetic and environmental factors may promote the activation of autoreactive T cells in the periphery, and these cells eventually migrate into the central nervous system (CNS). Once in the CNS, autoreactive T cells interact with activated antigen-presenting cells (APCs), such as astrocytes, macrophages/microglia, and dendritic cells (DCs), thus enhancing the immune response against myelin antigens. Sema7A that is expressed by activated CD4⁺ T cells may be involved in initiating the immune response by attracting monocytes and macrophages. The interaction of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored sema7A with $\alpha 1\beta 1$ -integrin on macrophages would promote the secretion of proinflammatory cytokines that may also instigate the activation of other immune cells in the CNS, such as T or B cells (1). Additionally, the immune function of sema3A may be diminished in patients with MS, leading to prolonged APC/T cell contact, thus favouring the overactivation of immune cells that are reactive to myelin antigens (2). With regard to neurodegenerative damage, the impaired axons are surrounded by numerous immune and glial cells that mediate either injury or neuroprotective effects. Although the CNS has the potential to repair lesions, neuroregeneration is limited by a negative molecular microenvironment. A putative imbalance between sema3A and sema3F may inhibit the migration of OPCs to the site of MS lesions, thus restricting the remyelination process (3). Moreover, sema7A may favour the maturation of the glial scar, which would indirectly enhance the secretion of sema3A and have a negative effect on axon outgrowth (4). Alternatively, sema3A may limit the neurodegenerative processes that occur in the CNS of patients with MS given that, under inflammatory conditions, sema3A that is secreted by stressed neurons may induce apoptosis in activated microglia (5). Abbreviations: sema, semaphorin; Np, neuropilin; PLXN-A, plexin-A; DC, dendritic cell; Mφ, macrophage; OPC, oligodendrocyte precursor cell.

immune cells. This effect would be mediated by the induction of proinflammatory cytokine secretion and, hence, would drive the immune responses that result in demyelination. Conversely, reduced sema3A expression or function leads to persistent contact between effector T cells and APCs, thus hyperactivating myelin-specific T cells. In the context of neurodegeneration, an imbalance between sema3A and sema3F expression levels may be partially responsible for the impaired remyelination that is observed in the MS-damaged CNS. The fact that sema7A

may favour maturation of the glial scar could indicate its indirect aid in creating a negative microenvironment for axonal regeneration; that is, the glial scar cells may secrete sema3A, which could act as a repulsive cue for regenerating axons. In addition, the soluble sema7A that is deposited in the extracellular matrix could recruit macrophages to lesions, thus favouring additional inflammatory events. By contrast, sema3A may be secreted by injured neurons and induce apoptosis in activated microglia and macrophages, thus promoting neuroprotection.

In summary, more studies on the diversity of the signalling pathways and receptors that are used by sema3A and sema7A are required to (i) better understand their roles in MS and (ii) develop novel therapeutic strategies that not only treat the inflammatory phase of the disease but also promote neuroregeneration and neuroprotection. A comprehensive characterisation of the expression of sema3A, sema7A, and their receptors should be performed in the context of EAE, throughout the progression of the disease, and in active and chronic lesions of MS patients. This would help to elucidate the role of both signalling pathways in the pathogenesis of MS and would therefore give a clue to the cell types that should be targeted in future therapeutic approaches. Moreover, functional *in vitro* models may help to solve remaining questions about the function of sema7A and sema3A. Determining the roles of the cleaved and GPI-anchored forms under both physiological and pathological conditions is essential for understanding the biological role of sema7A, both in the immune system and in the CNS. Understanding these aspects of sema3A and sema7A biology, as well as MS pathology, is a challenging, but significant, opportunity, one that could lead to the development of an effective combined immunomodulatory and neuroregenerative therapy for patients with MS.

Acknowledgements

We thank the 'Red Española de Esclerosis Múltiple (REEM)' (RD07/0060), sponsored by the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Instituto de Salud Carlos III, Ministry of Economy and Competitiveness, Spain, and the 'Ajuts per donar Suport als Grups de Recerca de Catalunya (2009 SGR 0793)', which is sponsored by the 'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca' (AGAUR), Generalitat de Catalunya, Spain. H.E. is supported by the 'Sara Borrell' programme (CD09/00363) from the FIS, Ministry of Economy and Competitiveness, Spain. The PFIS programme (FI10/00456), Ministry of Economy and Competitiveness, supports A.G. C.E. is partially supported by the 'Miguel Servet' programme (CP07/00146) from the FIS, Ministry of Economy and Competitiveness, Spain.

References

- 1 Pasterkamp, R.J. and Giger, R.J. (2009) Semaphorin function in neural plasticity and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19, 263–274
- 2 Roth, L. *et al.* (2009) The many faces of semaphorins: from development to pathology. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 649–666
- 3 Rehman, M. and Tamagnone, L. (2012) Semaphorins in cancer: biological mechanisms and therapeutic approaches. *Semin. Cell Dev. Biol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.10.005>
- 4 Kolodkin, A.L. *et al.* (1992) Fasciclin IV: sequence, expression, and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo. *Neuron* 9, 831–845
- 5 Semaphorin Nomenclature Committee (1999) Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. *Cell* 97, 551–552
- 6 Comeau, M.R. *et al.* (1998) A poxvirus-encoded semaphorin induces cytokine production from monocytes and binds to a novel cellular semaphorin receptor, VESPR. *Immunity* 8, 473–482
- 7 Tamagnone, L. *et al.* (1999) Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 99, 71–80
- 8 Pasterkamp, R.J. *et al.* (2003) Semaphorin 7A promotes axon outgrowth through integrins and MAPKs. *Nature* 424, 398–405
- 9 Suzuki, K. *et al.* (2007) Semaphorin 7A initiates T-cell-mediated inflammatory responses through $\alpha 1\beta 1$ integrin. *Nature* 446, 680–684
- 10 Suzuki, K. *et al.* (2008) Semaphorins and their receptors in immune cell interactions. *Nat. Immunol.* 9, 17–23
- 11 Takamatsu, H. and Kumanogoh, A. (2012) Diverse roles for semaphorin–plexin signaling in the immune system. *Trends Immunol.* 33, 127–135
- 12 Mizui, M. *et al.* (2009) Immune semaphorins: novel features of neural guidance molecules. *J. Clin. Immunol.* 29, 1–11
- 13 Luo, Y. *et al.* (1993) Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 75, 217–227
- 14 Adams, R.H. *et al.* (1997) The chemorepulsive activity of secreted semaphorins is regulated by furin-dependent proteolytic processing. *EMBO J.* 16, 6077–6086
- 15 Klostermann, A. *et al.* (1998) The chemorepulsive activity of the axonal guidance signal semaphorin D requires dimerization. *J. Biol. Chem.* 273, 7326–7331
- 16 Lepelletier, Y. *et al.* (2007) Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 5545–5550
- 17 Moretti, S. *et al.* (2008) Semaphorin3A signaling controls Fas (CD95)-mediated apoptosis by promoting Fas translocation into lipid rafts. *Blood* 111, 2290–2299
- 18 Ji, J.D. *et al.* (2009) Expression and function of semaphorin 3A and its receptors in human monocyte-derived macrophages. *Hum. Immunol.* 70, 211–217
- 19 Lepelletier, Y. *et al.* (2006) Immunosuppressive role of semaphorin-3A on T cell proliferation is mediated by inhibition of actin cytoskeleton reorganization. *Eur. J. Immunol.* 36, 1782–1793
- 20 Takamatsu, H. *et al.* (2010) Semaphorins guide the entry of dendritic cells into the lymphatics by activating myosin II. *Nat. Immunol.* 11, 594–600
- 21 Catalano, A. *et al.* (2006) Semaphorin-3A is expressed by tumor cells and alters T-cell signal transduction and function. *Blood* 107, 3321–3329
- 22 Tordjman, R. *et al.* (2002) A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat. Immunol.* 3, 477–482
- 23 Yamamoto, M. *et al.* (2008) Plexin-A4 negatively regulates T lymphocyte responses. *Int. Immunol.* 20, 413–420
- 24 Lepelletier, Y. *et al.* (2010) Galectin-1 and semaphorin-3A are two soluble factors conferring T-cell immunosuppression to bone marrow mesenchymal stem cell. *Stem Cells Dev.* 19, 1075–1079
- 25 Wen, H. *et al.* (2010) Plexin-A4-semaphorin 3A signaling is required for Toll-like receptor- and sepsis-induced cytokine storm. *J. Exp. Med.* 207, 2943–2957
- 26 Lange, C. *et al.* (1998) New eukaryotic semaphorins with close homology to semaphorins of DNA viruses. *Genomics* 51, 340–350
- 27 Xu, X. *et al.* (1998) Human semaphorin K1 is glycosylphosphatidylinositol-linked and defines a new subfamily of viral-related semaphorins. *J. Biol. Chem.* 273, 22428–22434
- 28 Kopp, M.A. *et al.* (2010) Spinal cord injury induces differential expression of the profibrotic semaphorin 7A in the developing and mature glial scar. *Glia* 58, 1748–1756
- 29 Yamada, A. *et al.* (1999) Molecular cloning of a glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule CDw108. *J. Immunol.* 162, 4094–4100
- 30 Holmes, S. *et al.* (2002) Sema7A is a potent monocyte stimulator. *Scand. J. Immunol.* 56, 270–275
- 31 Bobolis, K.A. *et al.* (1992) Isolation of the JMH antigen on a novel phosphatidylinositol-linked human membrane protein. *Blood* 79, 1574–1581
- 32 Morote-Garcia, J.C. *et al.* (2012) Endothelial Semaphorin 7A promotes neutrophil migration during hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 14146–14151
- 33 Hashimoto, M. *et al.* (2004) Regulation of semaphorin 3A expression in neurons of the rat spinal cord and cerebral cortex after transection injury. *Acta Neuropathol.* 107, 250–256
- 34 De Winter, F. *et al.* (2002) Injury-induced class 3 semaphorin expression in the rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 175, 61–75
- 35 Kaneko, S. *et al.* (2006) A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nat. Med.* 12, 1380–1389
- 36 Montolio, M. *et al.* (2009) A semaphorin 3A inhibitor blocks axonal chemorepulsion and enhances axon regeneration. *Chem. Biol.* 16, 691–701
- 37 Piaton, G. *et al.* (2011) Class 3 semaphorins influence oligodendrocyte precursor recruitment and remyelination in adult central nervous system. *Brain* 134, 1156–1167
- 38 Majed, H.H. *et al.* (2006) A novel role for Sema3A in neuroprotection from injury mediated by activated microglia. *J. Neurosci.* 26, 1730–1738

- 39 Holtmaat, A.J. *et al.* (2003) Transient downregulation of Sema3A mRNA in a rat model for temporal lobe epilepsy. A novel molecular event potentially contributing to mossy fiber sprouting. *Exp. Neurol.* 182, 142–150
- 40 Good, P.F. *et al.* (2004) A role for semaphorin 3A signaling in the degeneration of hippocampal neurons during Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 91, 716–736
- 41 Eastwood, S.L. *et al.* (2003) The axonal chemorepellant semaphorin 3A is increased in the cerebellum in schizophrenia and may contribute to its synaptic pathology. *Mol. Psychiatry* 8, 148–155
- 42 Mine, T. *et al.* (2000) CDw108 expression during T-cell development. *Tissue Antigens* 55, 429–436
- 43 Pasterkamp, R.J. *et al.* (2007) Expression patterns of semaphorin7A and plexinC1 during rat neural development suggest roles in axon guidance and neuronal migration. *BMC Dev. Biol.* 7, 98
- 44 Okuno, T. *et al.* (2011) The role of immune semaphorins in multiple sclerosis. *FEBS Lett.* 585, 3829–3835
- 45 Catalano, A. (2010) The neuroimmune semaphorin-3A reduces inflammation and progression of experimental autoimmune arthritis. *J. Immunol.* 185, 6373–6383
- 46 Solomon, B.D. *et al.* (2011) Neuropilin-1 attenuates autoreactivity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 2040–2045
- 47 Williams, A. *et al.* (2007) Semaphorin 3A and 3F: key players in myelin repair in multiple sclerosis? *Brain* 130, 2554–2565
- 48 Syed, Y.A. *et al.* (2011) Inhibition of CNS remyelination by the presence of semaphorin 3A. *J. Neurosci.* 31, 3719–3728
- 49 Comabella, M. *et al.* (2010) Cerebrospinal fluid chitinase 3-like 1 levels are associated with conversion to multiple sclerosis. *Brain* 133, 1082–1093
- 50 Czopik, A.K. *et al.* (2006) Semaphorin 7A is a negative regulator of T cell responses. *Immunity* 24, 591–600
- 51 Sospedra, M. and Martin, R. (2005) Immunology of multiple sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 683–747
- 52 Sawcer, S. *et al.* (2011) Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476, 214–219
- 53 Goverman, J. *et al.* (1993) Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. *Cell* 72, 551–560
- 54 Rivers, T.M. *et al.* (1933) Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J. Exp. Med.* 58, 39–53
- 55 Gold, R. *et al.* (2006) Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129, 1953–1971
- 56 McFarland, H.F. and Martin, R. (2007) Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat. Immunol.* 8, 913–919
- 57 Villar, L.M. *et al.* (2005) Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J. Clin. Invest.* 115, 187–194
- 58 De Keyser, J. *et al.* (2003) Are astrocytes central players in the pathophysiology of multiple sclerosis? *Arch Neurol.* 60, 132–136
- 59 Levine, J.M. *et al.* (2001) The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends Neurosci.* 24, 39–47
- 60 Dutta, R. and Trapp, B.D. (2007) Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis. *Neurology* 68, S22–S31 discussion S43–S54

