



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa de Doctorado en Bioquímica, Biología molecular y Biomedicina

**DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS DE
TERAPIA GÉNICA COMO TRATAMIENTO
INMUNOMODULADOR DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

TESIS DOCTORAL

Ángel Edo Salvador

2020

Directores: Miguel Chillón Rodríguez y Carmen Espejo Ruiz



Universitat Autònoma de Barcelona



**DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS DE
TERAPIA GÉNICA COMO TRATAMIENTO
INMUNOMODULADOR DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

Memoria presentada por

Ángel Edo Salvador

Para optar al título de

Doctor en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

Tesis realizada bajo la dirección del Dr. Miguel Chillón y la Dra. Carmen Espejo

Director: Dr. Miguel Chillón

Directora: Dra. Carmen Espejo

Doctorando: Ángel Edo

Resumen

La esclerosis múltiple es una enfermedad desmielinizante de etiología desconocida, sin embargo, está ampliamente estudiado que el sistema inmunitario es el causante de los ataques inflamatorios contra la mielina de los axones neuronales. Este hecho acaba produciendo una desmielinización y neurodegeneración del sistema nervioso central y con ello una disfunción cognitiva y motora progresiva característica de la enfermedad. Existen diversas citoquinas clave en la inmunopatogenia de la enfermedad que están involucradas bien en la respuesta efectora como la IL-21 o bien en el control de la inflamación como la IL-37. En el presente trabajo se han desarrollado dos estrategias de terapia génica basadas en la administración de vectores adenoasociados portadores de las moléculas terapéuticas con el objetivo de modular la respuesta inflamatoria desarrollada en la encefalomielitis autoinmune experimental, modelo animal de la esclerosis múltiple.

Inicialmente se testó el efecto terapéutico del bloqueo de la citoquina pro-inflamatoria IL-21 mediante la administración de un receptor soluble específico diseñado en nuestro laboratorio. La administración preventiva de la terapia mostró un efecto protector reduciendo el número de animales que desarrollaron la enfermedad, así como una mejoría a nivel histopatológico y una modificación del perfil inmunológico. El efecto beneficioso también se observó al inducir la expresión del receptor soluble una vez establecidos los primeros síntomas neurológicos en un abordaje terapéutico. Sin embargo, la aplicación del tratamiento durante el desarrollo de la respuesta inmune resultó contraproducente, poniendo de manifiesto la pleiotropicidad de esta citoquina en las diversas etapas clínicas de la patología.

Posteriormente se estudió el efecto terapéutico de la IL-37, una citoquina humana, ausente en ratones, con potente actividad anti-inflamatoria. El tratamiento preventivo con un vector portador de la forma madura de esta interleuquina produjo una mejora clínica y una disminución de la respuesta inflamatoria desarrollada en los animales. Por otro lado, el tratamiento terapéutico con IL-37 no mostró una mejora clínica apreciable, probablemente debido a la propia estrategia de terapia génica en las condiciones experimentales testadas y no a una ausencia de efecto terapéutico de la molécula.

En resumen, ambas terapias precisan de estudios adicionales en el futuro que acaben de definir las condiciones experimentales idóneas para su aplicación, sin embargo, ambos tratamientos han mostrado resultados esperanzadores convirtiéndose en posibles nuevas terapias capaces de ejercer una inmunomodulación efectiva de la respuesta inflamatoria desarrollada en la esclerosis múltiple.

Índice

| | |
|---|-----------|
| Abreviaturas..... | 1 |
| Introducción..... | 7 |
| 1.- Enfermedades autoinmunes | 9 |
| 2.- Esclerosis múltiple | 10 |
| 2.1.- Definición y epidemiología | 10 |
| 2.2.- Aspectos clínicos..... | 12 |
| 2.2.1.- Sintomatología..... | 12 |
| 2.2.2.- Formas clínicas..... | 13 |
| 2.2.3.- Diagnóstico | 15 |
| 2.2.4.- Anatomía patológica..... | 16 |
| 2.3.- Etiología | 18 |
| 2.3.1.- Factores genéticos | 18 |
| 2.3.2.- Factores ambientales..... | 19 |
| 2.4.- Inmunopatogenia | 21 |
| 2.4.1.- Origen de la respuesta autoinmune | 21 |
| 2.4.2.- Principales componentes celulares de la respuesta inflamatoria..... | 24 |
| 2.4.3.- Etapas del proceso inflamatorio | 30 |
| 2.5.- Tratamientos actuales | 33 |
| 2.5.1.- Tratamientos modificadores de la enfermedad para la EMRR | 34 |
| 2.5.2.- Tratamientos de las formas progresivas de EM..... | 36 |
| 2.6.- Encefalomiелitis autoinmune experimental..... | 37 |
| 2.6.1.- Inducción de la EAE..... | 38 |
| 2.6.2.- Curso clínico..... | 38 |
| 2.6.3.- Histopatología de la EAE | 40 |
| 3.- Interleuquina 21 | 40 |
| 3.1.- Inmunobiología de la IL-21 | 41 |
| 3.1.1.- IL-21 y células T..... | 42 |
| 3.1.2.- IL-21 y células B..... | 43 |
| 3.2.- Implicación de la IL-21 en patologías autoinmunes | 43 |
| 3.2.1.- Papel de la IL-21 en la EM..... | 43 |
| 3.2.2.- Bloqueo de la IL-21 como tratamiento para la RA y el SLE | 45 |

| | |
|---|-----------|
| 4.- Interleuquina 37 | 45 |
| 4.1.- Procesamiento, secreción y mecanismos de acción | 46 |
| 4.2.- Inmunobiología de la IL-37 | 48 |
| 4.2.1.- IL-37 en inmunidad innata | 48 |
| 4.2.2.- IL-37 en inmunidad adaptativa | 48 |
| 4.3.- IL-37 en patologías autoinmunes..... | 49 |
| 5.- Terapia génica..... | 50 |
| 5.1.- Vectores virales para terapia génica..... | 51 |
| 5.1.1.- Vectores adenoasociados | 52 |
| Hipótesis y objetivos..... | 59 |
| 1.- Hipótesis..... | 61 |
| 2.- Objetivos | 61 |
| Materiales y métodos..... | 63 |
| 1.- Materiales | 65 |
| 1.1.- Animales | 65 |
| 1.2.- Vectores plasmídicos y virales | 65 |
| 1.3.- Líneas celulares..... | 65 |
| 2.- Métodos | 66 |
| 2.1.- Generación de vectores plasmídicos | 66 |
| 2.1.1.- Digestión mediante enzimas de restricción..... | 66 |
| 2.1.2.- Clonaje..... | 66 |
| 2.1.3.- Transformación de bacterias quimiocompetentes..... | 68 |
| 2.2.- Obtención y análisis de DNA..... | 68 |
| 2.2.1.- Minipreparaciones de DNA plasmídico | 68 |
| 2.2.2.- Maxipreparaciones de DNA plasmídico..... | 69 |
| 2.2.3.- Extracción de DNA de bajo peso molecular de muestras de tejido (Extracción de Hirt) | 70 |
| 2.2.4.- Electroforesis de DNA en gel de agarosa | 70 |
| 2.2.5.- Purificación de fragmentos de DNA..... | 71 |
| 2.2.6.- Cuantificación de DNA..... | 71 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3.- Obtención y análisis de RNA..... | 71 |
| 2.3.1.- Extracción de RNA de tejido y células en cultivo | 71 |
| 2.3.2.- Extracción de RNA de esplenocitos | 72 |
| 2.3.3.- Tratamiento con DNasa y retrotranscripción | 72 |
| 2.3.4.- PCR cuantitativa (qPCR) | 73 |
| 2.4.- Obtención y análisis de proteínas..... | 74 |
| 2.4.1.- Extracción de proteínas | 74 |
| 2.4.2.- Cuantificación de proteínas | 75 |
| 2.4.3.- Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) | 75 |
| 2.4.4.- Electrotransferencia | 76 |
| 2.4.5.- Inmunodetección..... | 77 |
| 2.4.6.- Densitometría de bandas..... | 78 |
| 2.4.7.- Inmunocitoquímica de distribución celular del sIL-21R..... | 78 |
| 2.5.- Técnicas de cultivo celular | 79 |
| 2.5.1.- Línea celular HEK293 | 79 |
| 2.5.2.- Cultivos primarios de esplenocitos de ratón | 80 |
| 2.5.3.- Estudio del bloqueo de la actividad de la IL-21 con sIL-21R <i>in vitro</i> | 81 |
| 2.5.4.- Aislamiento de hepatocitos de ratón | 81 |
| 2.6.- Vectores virales | 82 |
| 2.6.1.- Producción y purificación de vectores AAVs..... | 82 |
| 2.6.2.- Producción y purificación de vectores Ads | 85 |
| 2.6.3.- Infección de células en cultivo con vectores virales | 88 |
| 2.7.- Estudios <i>in vivo</i> con el modelo EAE | 88 |
| 2.7.1.- Inducción de la EAE en ratones y seguimiento clínico | 88 |
| 2.7.2.- Histopatología e inmunotinción del SNC | 90 |
| 2.7.3.- Ensayos inmunológicos..... | 92 |
| 2.7.4.- Análisis estadístico..... | 96 |
| Resultados..... | 97 |
| Capítulo 1: Modulación de la respuesta inmune mediante la administración de vectores virales codificantes del receptor soluble de la IL-21 | 99 |
| 1.1.- Estrategia terapéutica y diseño del receptor soluble | 99 |
| 1.1.1.- Generación de los vectores virales portadores del sIL-21R | 100 |
| 1.2.- Caracterización bioquímica y funcional del receptor | 101 |
| 1.2.1.- Distribución celular y secretabilidad del receptor soluble..... | 101 |

| | |
|--|------------|
| 1.2.2.- Estudio de la capacidad de bloqueo del sIL-21R..... | 103 |
| 1.3.- Tratamiento preventivo con AAV8.CMV.sIL21R en el modelo murino de EAE..... | 105 |
| 1.3.1.- Diseño experimental..... | 105 |
| 1.3.2.- Efecto de la administración sistémica de vectores virales en el modelo de EAE..... | 107 |
| 1.3.3.- Estudio del potencial terapéutico del tratamiento preventivo con AAV8.CMV.sIL21R..... | 110 |
| 1.3.4.- Estudio histopatológico del SNC de animales tratados con AAV8.CMV.sIL21R..... | 112 |
| 1.3.5.- Estudio del perfil inmunológico de los animales tratados con AAV8.CMV.sIL21R | 114 |
| 1.4.- Aproximación terapéutica temprana con AAV8.CAG.sIL21R en el modelo murino de EAE | |
| | 124 |
| 1.4.1.- Diseño experimental..... | 124 |
| 1.4.2.- Resultados clínicos del tratamiento terapéutico temprano con AAV8.CAG.sIL21R | 125 |
| 1.4.3.- Valoración del efecto clínico de la administración de vectores virales en días cercanos a la | |
| inmunización..... | 128 |
| Capítulo 2: Terapia anti-inflamatoria mediante vectores virales codificantes de la IL-37 | |
| humana | 131 |
| 2.1.- Generación de los vectores virales portadores de la IL-37 | 131 |
| 2.2.- Estudio del potencial terapéutico del AAV8.CMV.pre-IL37 y AAV8.CMV.IL37 en el modelo | |
| murino de EAE | 132 |
| 2.3.- Estudio del potencial terapéutico del tratamiento preventivo con AAV8.CAG.IL37 | 134 |
| 2.3.1.- Estudio histopatológico del SNC de animales tratados con AAV8.CAG.IL37 | 135 |
| 2.3.2.- Estudio del perfil inmunológico de los animales tratados con AAV8.CAG.IL37..... | 137 |
| Capítulo 3: Desarrollo de la aplicación de vectores inducibles para el tratamiento | |
| terapéutico de la EAE | 144 |
| 3.1.- Diseño y generación de los vectores inducibles portadores de las moléculas terapéuticas | |
| | 144 |
| 3.2.- Validación <i>in vitro</i> del sistema inducible..... | 146 |
| 3.3.- Puesta a punto del sistema de inducción <i>in vivo</i> | 148 |
| 3.4.- Experimento terapéutico con vectores TetOn portadores de las moléculas terapéuticas. | |
| | 150 |
| 3.4.1.- Diseño experimental..... | 150 |
| 3.4.2.- Análisis de toxicidad de la Dox en el modelo de EAE..... | 151 |
| 3.4.3.- Estudio de la expresión hepática de eGFP | 152 |

| | |
|---|------------|
| 3.4.4.- Resultados clínicos del tratamiento terapéutico con AAV8.TetOn.sIL21R y AAV8.TetOn.IL37 | 154 |
| Discusión..... | 157 |
| 1.- Estrategias de terapia génica para el tratamiento de la EM..... | 159 |
| 2.- Modulación de la respuesta inmune mediante vectores virales codificantes del receptor soluble de la IL-21..... | 163 |
| 2.1.- Tratamiento preventivo con sIL-21R en el modelo de EAE | 165 |
| 2.2.- Tratamiento terapéutico con sIL-21R en el modelo de EAE | 170 |
| 3.- Terapia anti-inflamatoria mediante vectores virales codificantes de la IL-37 humana | 171 |
| 3.1.- Tratamiento preventivo con IL-37 en el modelo de EAE | 172 |
| 3.2.- Aproximación terapéutica con vectores inducibles codificantes de la IL-37 en el modelo de EAE..... | 175 |
| 4.- Consideraciones finales | 176 |
| Conclusiones..... | 179 |
| Bibliografía..... | 183 |
| Anexo..... | 207 |
| 1.- Vectores plasmídicos y virales generados | 209 |
| 1.1.- Vectores plasmídicos | 209 |
| 1.2.- Vectores virales | 209 |
| 2.- Oligos utilizados para qPCR..... | 210 |
| 2.1.- Oligos para estudios de expresión de transgenes | 210 |
| 2.2.- Sondas Taqman para estudios de poblaciones inmunes y citoquinas..... | 210 |
| 2.2.1.- Sondas TaqMan inventariadas..... | 210 |
| 2.2.2.- Sonda TaqMan Rorc2 custom | 210 |
| 3.- Anticuerpos utilizados en citometría de flujo | 211 |

Abreviaturas

| | |
|--------------|--|
| AAP | Proteína activadora del ensamblaje |
| AAV | Virus adenoasociado |
| AAVR | Receptor de virus adenoasociado |
| Ad | Adenovirus |
| APC | Célula presentadora de antígeno |
| AUC | Área bajo la curva |
| BCA | Ácido bicinconínico |
| BHE | Barrera hematoencefálica |
| Breg | Célula B reguladora |
| BSA | Albúmina sérica bovina |
| CAG | <i>CMV/chicken β-actin promoter</i> |
| CCR6 | Receptor-6 de quimioquinas de tipo CC |
| cDNA | DNA complementario |
| CFA | Adyuvante completo de Freund |
| CIS | Síndrome clínico aislado |
| CMV | Citomegalovirus |
| CTLA4 | Antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico |
| CXCR3 | Receptor-3 de quimioquinas de tipo CXC |
| DC | Célula dendrítica |
| DMEM | Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| Dox | Doxiciclina |
| dsDNA | DNA de cadena doble |
| EAE | Encefalomiелitis autoinmune experimental |
| EBV | Virus de Epstein-Barr |
| eGFP | Proteína fluorescente verde mejorada |
| EGFR | Receptor del factor de crecimiento epidérmico |
| EM | Esclerosis múltiple |
| EME | Esclerosis Múltiple España |
| EMPP | Esclerosis múltiple primariamente progresiva |
| EMRR | Esclerosis múltiple remitente-recurrente |
| EMSP | Esclerosis múltiple secundariamente progresiva |
| FBS | Suero fetal bovino |

Abreviaturas

| | |
|-------------------------------|---|
| FGFR | Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos |
| GFAP | Proteína ácida fibrilar glial |
| GFP | Proteína fluorescente verde |
| GM-CSF | Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos |
| gv | Genomas virales |
| GWAS | Estudios de asociación del genoma completo |
| HE | Hematoxilina-eosina |
| HGFR | Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos |
| HLA | Antígeno leucocitario humano |
| HSV | Herpes simplex virus |
| HUVH | Hospital Universitari Vall d' Hebron |
| i.p | Intraperitoneal |
| i.v | Intravenoso |
| ICAM-1 | Molécula de adhesión intercelular-1 |
| IFA | Adyuvante incompleto de Freund |
| IFNβ | Interferón- β |
| IFNγ | Interferón- γ |
| IgG | Inmunoglobulina de tipo G |
| IL | Interleuquina |
| IL-R | Receptor de interleuquina |
| iNOS | Sintasa del óxido nítrico inducible |
| ITR | Repetición terminal invertida |
| IU | Unidades infecciosas |
| KB | Klüver-Barrera |
| KO | <i>Knock-out</i> |
| LAG3 | Gen de activación linfocitaria-3 |
| LamR | Receptor de laminina-1 |
| LB | Medio Luria Broth |
| LCR | Líquido cefalorraquídeo |
| IDC | Célula dendrítica linfoide |
| LEA | Lycopersicon esculentum aglutinina |
| LFA-1 | Antígeno-1 asociado a la función linfocitaria |
| MAG | Glicoproteína asociada a mielina |

| | |
|--------------|---|
| MCS | Sitio de clonaje múltiple |
| mDC | Célula dendrítica mieloide |
| MFI | Mediana de la intensidad de fluorescencia |
| MHC | Complejo mayor de histocompatibilidad |
| MMP | Metaloproteasa |
| MOBP | Proteína básica asociada a la mielina de oligodendrocitos |
| MOG | Proteína mielínica de oligodendrocitos |
| MOI | Multiplicidad de infección |
| mRNA | RNA mensajero |
| NAb | Anticuerpo neutralizante |
| NK | Célula <i>natural killer</i> |
| NKT | Célula <i>natural killer T</i> |
| O/N | <i>Over night</i> |
| OPC | Célula progenitora de oligodendrocitos |
| ORF | Marco abierto de lectura |
| OSP | Proteína específica de oligodendrocitos |
| p.i | Post-inmunización |
| P/S | Penicilina/Estreptomincina |
| PBMC | Célula mononuclear de sangre periférica |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PDGFR | Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas |
| PEG | Polietilenglicol |
| PEI | Polietilenimina |
| PEV | Potenciales evocados visuales |
| PHA | Fitohemaglutinina |
| PLP | Proteína proteolipídica |
| PoliA | Señal de poliadenilación |
| qPCR | Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa |
| RA | Artritis reumatoide |
| rAAV | Virus adenoasociado recombinante |
| REML | Estimación por máxima verosimilitud restringida |
| RM | Resonancia magnética |

Abreviaturas

| | |
|-------------------------------|---|
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RNS | Especie reactiva de nitrógeno |
| ROS | Especie reactiva de oxígeno |
| RT | Temperatura ambiente |
| SEM | Error estándar de la media |
| SF | Suero fisiológico |
| sIL-21R | Receptor soluble de la interleuquina 21 |
| SLE | Lupus sistémico eritematoso |
| SMI-32 | Neurofilamentos no fosforilados |
| SN | Sobrenadante |
| SNC | Sistema nervioso central |
| ssDNA | DNA de cadena simple |
| TEMED | Tetrametil-etilen-diamida |
| TetOn | Sistema inducible por tetraciclinas |
| Tfh | Célula T <i>helper</i> folicular |
| Tg | Transgénico |
| TGFβ | Factor de crecimiento transformante β |
| Th | Célula T <i>helper</i> |
| TLR | <i>Toll-like receptor</i> |
| TMEV | Encefalomiелitis murina de Theiler |
| TNFα | Factor de necrosis tumoral alfa |
| Tr | Transactivador |
| Tr1 | Célula T reguladora de tipo 1 |
| Treg | Célula T reguladora |
| U | Unidades |
| UPV | Unidad de producción de vectores |
| UV | Ultravioleta |
| VCAM-1 | Molécula de adhesión celular vascular-1 |
| VHIR | Vall d'Hebron Institut de Recerca |
| VLA-4 | Antígeno de activación tardía-4 |
| wtAAV | Virus adenoasociado <i>wild type</i> |

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

Introducción

1.- Enfermedades autoinmunes

Históricamente las enfermedades autoinmunes eran consideradas enfermedades raras, sin embargo, diversos estudios epidemiológicos determinaron que muchas de las enfermedades inflamatorias crónicas que conocemos actualmente tienen una etiología autoinmune. Este tipo de patologías, desgraciadamente, son cada vez más comunes en la población, llegando a tener una incidencia de hasta el 3-5 %, como es el caso de la diabetes de tipo 1. Los pacientes que padecen estas enfermedades se caracterizan por una respuesta exacerbada del sistema inmunitario, el cual ataca a elementos propios del organismo desencadenando procesos lesivos e inflamatorios (Cho and Gregersen, 2011).

La autoinmunidad puede ser clasificada como fisiológica o patológica. La fisiológica es transitoria y no cursa con sintomatología clínica ya que su función es el mantenimiento de la homeostasis del organismo. Pero cuando la inmunotolerancia se rompe, los autoanticuerpos y linfocitos autorreactivos producen una inflamación generando una autoinmunidad patológica que acaba produciendo un daño tisular, que puede ser en un órgano específico, como en la artritis reumatoide (RA), o involucrar a múltiples órganos, como en el lupus sistémico eritomatoso (SLE). La hipótesis más aceptada es que polimorfismos en varios genes resultan en una regulación defectiva o en un aumento de la sensibilidad de la activación linfocitaria y que son los factores ambientales los que inician o aumentan la activación de linfocitos autorreactivos que escapan del control central y son capaces de reaccionar ante antígenos propios (Wang et al., 2015) (Figura 1).

Se considera que todas las enfermedades autoinmunes presentan una fase de iniciación, propagación y resolución de manera secuencial. Es en la fase de propagación cuando aparecen los síntomas clínicos generándose un ciclo en el que nuevos epítopos antigénicos activan más linfocitos de diferentes especificidades desencadenando un mayor daño tisular y así sucesivamente. Al mismo tiempo, se genera un microambiente inflamatorio en el cual las células inmunes interactúan y producen citoquinas y mediadores que amplifican la reacción inflamatoria. Es en la fase de resolución cuando

se produce una mayor activación de células T reguladoras (Tregs) y control de la inflamación en un intento de restablecer el equilibrio, generándose así un ciclo de inflamación y resolución de ésta (Rosenblum et al., 2015).

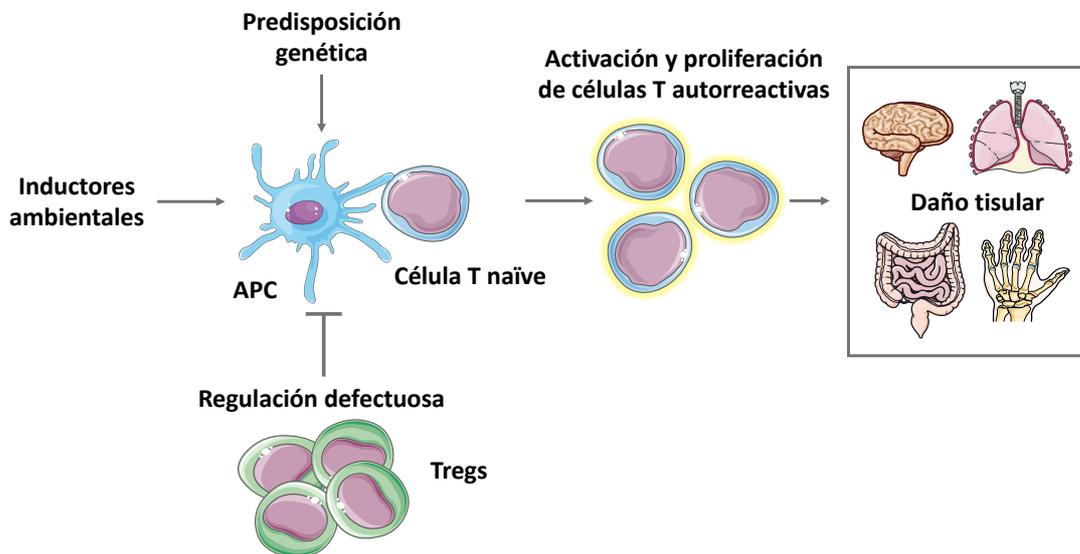


Figura 1.- Etiología de las enfermedades autoinmunes. La combinación de factores genéticos y ambientales o una regulación defectuosa de manera individual o combinada pueden llevar al escape, activación y proliferación de linfocitos autorreactivos. APC: célula presentadora de antígeno, Tregs: células T reguladoras. Figura adaptada de (Rosenblum et al., 2015).

2.- Esclerosis múltiple

2.1.- Definición y epidemiología

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica inflamatoria y desmielinizante del sistema nervioso central (SNC) mediada por el sistema inmune. Es la enfermedad desmielinizante de mayor prevalencia a nivel mundial, existiendo actualmente más de 2,5 millones de pacientes en todo el mundo. La prevalencia general de la enfermedad ha aumentado significativamente desde 1950 llegando a multiplicarse en 2,5 veces, especialmente en mujeres, evolucionando de un ratio mujeres:hombres de 2:1 a 3,5:1 en la actualidad. La prevalencia es muy heterogénea entre diferentes países, siendo esta patología más común en Europa y Norte-América frente a otras zonas con menor prevalencia como el este asiático y África subsahariana. Tanto en América como Europa se ha descrito un gradiente de prevalencia siendo mayor en el norte que en el sur, llegándose a registrar incidencias de 1/400 en países de alta altitud (Rosati, 2001; Alonso

and Hernán, 2008; Koch-Henriksen and Sørensen, 2010; Howard et al., 2016; Filippi et al., 2018) (Figura 2).

El Comité Asesor de la asociación Esclerosis Múltiple España (EME) informó en 2019 de una prevalencia de 120/100.000 habitantes en nuestro país, suponiendo más de 55.000 pacientes totales (75% mujeres), diagnosticándose 1.800 nuevos pacientes cada año. Estos datos sitúan a España en un rango de riesgo medio-alto a nivel mundial (EME, 2019).

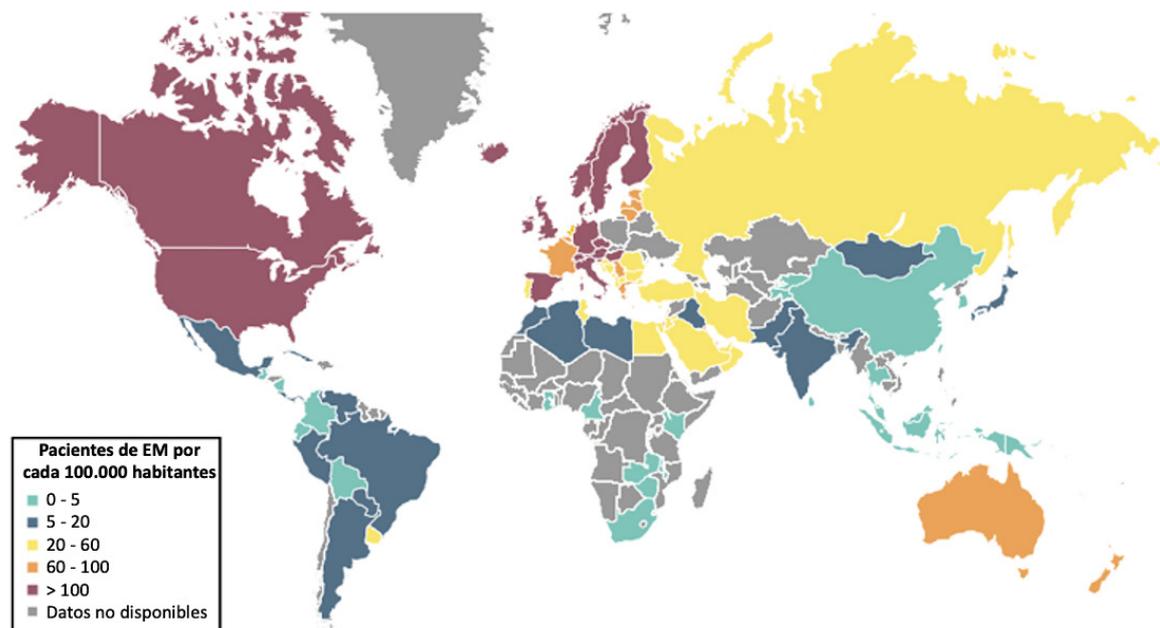


Figura 2.- Prevalencia de la EM por países a nivel mundial. Se observa una correlación entre la prevalencia y la latitud. Figura adaptada de Atlas de EM 2013. Federación Internacional de Esclerosis Múltiple (MSIF, 2014).

Varios estudios concluyen que entre el 70-90% de los pacientes con EM siguen vivos tras 25 años desde el diagnóstico. Casi el 70% de las muertes de los pacientes están relacionadas de manera directa con la enfermedad debido a la progresiva discapacidad. Otras causas de muerte son: patologías cardiovasculares, cáncer y la alta tasa de suicidios derivada de los problemas psicológicos que conlleva esta patología. Los países desarrollados han experimentado un incremento de la esperanza de vida y una disminución de la mortalidad en sus pacientes con EM. Esto combinado con un aumento de la prevalencia hace que haya un mayor número de pacientes crónicos que precisen de tratamientos y cuidados (Leray et al., 2016).

2.2.- Aspectos clínicos

2.2.1.- Sintomatología

Se pueden observar una gran variedad de síntomas neurológicos en función de la región del SNC que se ve afectada por la desmielinización, siendo los nervios ópticos, la médula espinal y el tronco encefálico comúnmente afectados. Hay muy pocos síntomas clínicos que son específicos de la patología, sin embargo, hay dos que se han asociado particularmente a la EM: el fenómeno de Uthoff que se trata de la tendencia al empeoramiento de los síntomas clínicos con el calor y el fenómeno de Lhermitte, término usado para describir la parestesia en las extremidades al flexionar el cuello debido a una afectación dorsal de la médula (Lewis and Spillane, 2019).

Los síntomas primarios son aquellos que se derivan del daño directo que se produce sobre la mielina y las fibras nerviosas del SNC (Tabla 1). De ellos se derivan los síntomas secundarios como pueden ser infecciones del tracto urinario debido a la disfunción de la vejiga, pérdida del tono muscular debido a la inactividad (no asociada a la desmielinización), disminución de la densidad ósea, etc. Por lo que, atendiendo a las definiciones anteriores, la manera óptima de tratar estos síntomas es erradicar los síntomas primarios. Finalmente, los síntomas terciarios son aquellos que incluyen afectaciones psicológicas, vocacionales y sociales derivadas de llevar a cabo una vida con la enfermedad como: trastornos de ánimo, ansiedad, aislamiento, estrés, etc. (Compston and Coles, 2008; Ghasemi et al., 2017; Lewis and Spillane, 2019; Brodkey et al., 2002; National multiple sclerosis society, 2020).

Tabla 1.- Síntomas primarios de la EM

| Frecuencia | Origen | Síntomas | Signos |
|-------------|---------------|----------------------|---|
| Más comunes | Cerebro | Disfunción cognitiva | Déficit de atención, razonamiento y función ejecutiva, pérdida de memoria a corto plazo, demencia |
| | | Afectivos | Depresión clínica |
| | Nervio óptico | Neuritis óptica | Dolor en el movimiento ocular, visión borrosa, disminución de la agudeza visual, disminución de la visión del color |

(Continuación tabla 1)

| | | | |
|------------------------------------|------------------------------------|--|--|
| Más comunes | Cerebelo y vías cerebelosas | Torpeza y pérdida del equilibrio | Descoordinación de extremidades y ataxia del paso |
| | Tronco encefálico | Diplopía y oscilopsia | Nistagmo, oftalmoplegias internucleares y otras más complejas |
| | | Mareo y vértigo | |
| | | Síntomas paroxísticos | |
| | Médula espinal | Debilidad muscular focal | Pérdida de la coordinación motora fina, dificultad para caminar, debilidad en extremidades |
| | | Rigidez y espasmos dolorosos | Espasticidad |
| Problemas intestinales y de vejiga | | Incontinencia urinaria y/o fecal, estreñimiento | |
| Problemas sexuales | | Disfunción eréctil, sequedad vaginal, disminución de sensibilidad y lívido | |
| Otro | Fatiga | Cansancio, dificultad para concentrarse | |
| | Dolor | | |
| Menos comunes | Cerebro | Epilepsia | |
| | Cerebelo y vías cerebelosas | Temblores | Temblor postural y de acción, disartria |
| | Tronco encefálico | Dificultad para tragar | Disartria |
| Dificultad en el habla | | Parálisis pseudobulbar | |

Tabla realizada a partir de información extraída de (Brodkey et al., 2002; Compston and Coles, 2008; National multiple sclerosis society, 2020).

2.2.2.- Formas clínicas

La EM se caracteriza por la aparición de brotes, los cuales se tratan de episodios clínicos con una duración superior a 24 horas en los que aparecen nuevos síntomas o el empeoramiento de los ya presentes. Se sospecha que una persona puede padecer EM cuando presenta un síndrome clínico aislado (CIS), el cual puede ser mono o polisintomático en función de la localización de las lesiones y durar al menos 24 horas para que sea categorizado como brote. Este episodio es característico de la EM, sin embargo, no es criterio suficiente dado que hay pacientes que pueden sufrir un CIS sin desarrollar la enfermedad. Cuando el CIS va acompañado de lesiones características de la EM perceptibles mediante resonancia magnética (RM), existe una mayor probabilidad de desarrollar EM (Lublin et al., 2014; Dobson and Giovannoni, 2019). Existen tres formas clínicas de la EM, las cuales han sido consensuadas en función de los patrones de

presentación de síntomas de los pacientes (Lublin et al., 2014; Dendrou et al, 2015) (Figura 3):

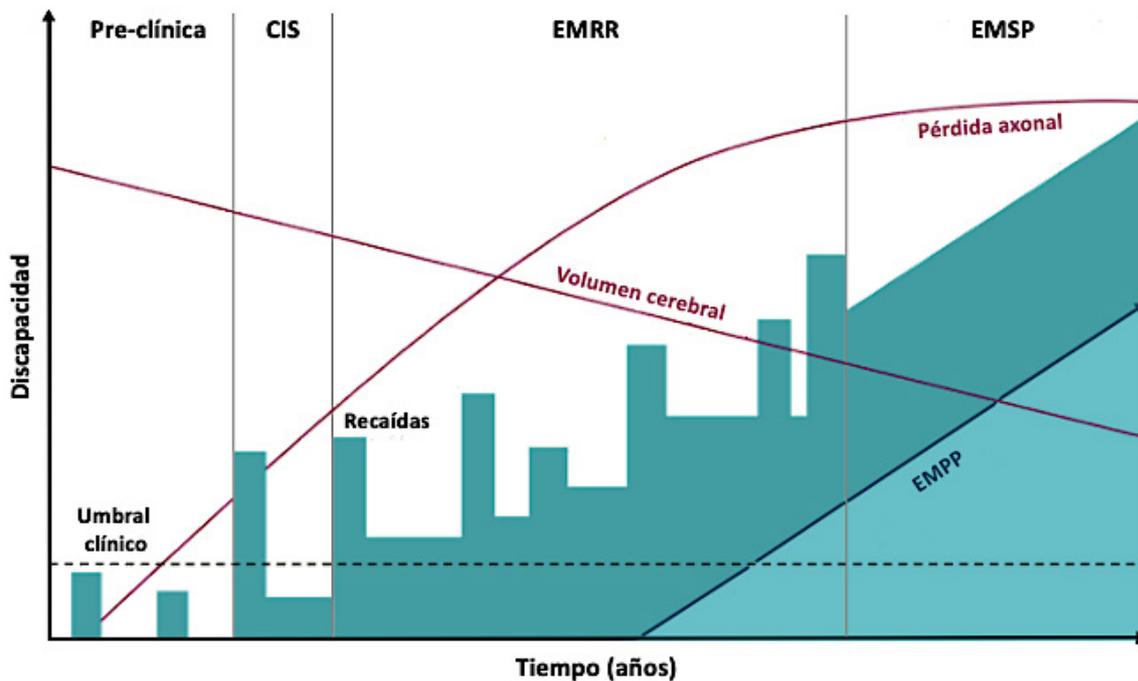


Figura 3.- Formas clínicas de la EM. Figura adaptada de (Baecher et al., 2018).

- 1. EM remitente – recurrente (EMRR):** es la forma clínica más común que afecta a un 85% de los pacientes. Se caracteriza por la presentación de brotes o exacerbaciones seguidos de períodos de recuperación completa o parcial (remisiones). Los brotes coinciden con procesos inflamatorios focalizados en el SNC y desmielinización que pueden ser valorados mediante RM, mientras que en las remisiones los síntomas pueden desaparecer o continuar y convertirse en permanentes.
- 2. EM secundariamente progresiva (EMSP):** aproximadamente el 80 % de los pacientes con EMRR acaban desarrollando este tipo de EM tras una o dos décadas desde el diagnóstico. En esta forma clínica, las lesiones inflamatorias ya no son tan características, sino que se produce un empeoramiento neurológico progresivo acompañado de una atrofia del SNC caracterizado por una disminución del volumen cerebral y un incremento de la degeneración neuroaxonal.

- 3. EM primariamente progresiva (EMPP):** es la forma clínica más rara dado que sólo el 15% de los pacientes la desarrollan. Se caracteriza por un empeoramiento de la función neurológica con ausencia de remisiones generando una acumulación de la discapacidad desde el diagnóstico, el cual es más tardío que en el caso de la EMRR. Pueden existir algunos periodos de cierta estabilidad, pero no de mejora de los síntomas.

2.2.3.- Diagnóstico

El diagnóstico de la EM requiere la existencia de una evidencia objetiva de una diseminación espacio-temporal de las lesiones en el SNC. La diseminación en el tiempo requiere que haya al menos dos episodios con actividad inflamatoria separados por un mes como mínimo. Mientras, que la diseminación en el espacio requiere demostrar que hay afectación de al menos dos zonas neuroanatómicas diferentes en el SNC (Polman et al., 2011).

Los criterios de diagnóstico de la EM han ido modificándose a lo largo de los años. Inicialmente, el diagnóstico era puramente clínico en el cual se tenía en cuenta el historial clínico del paciente, exámenes médicos y la existencia de al menos dos brotes clínicos separados en tiempo y espacio. En 1983 se definieron los criterios de Poser, los cuales pusieron de manifiesto la importancia de las primeras evidencias paraclínicas como la detección de anormalidades electrofisiológicas y por neuroimagen, que pudiesen sustituir la diseminación espacial como criterio de diagnóstico, dando especial importancia también al análisis de bandas oligoclonales de líquido cefalorraquídeo (LCR) (Poser et al., 1983). Las bandas oligoclonales son IgGs presentes en el LCR y que no se encuentran en el suero, indicando su producción a nivel intratecal. Esta prueba es la más específica de todas las que se realizan en el LCR ya que más del 95 % de los pacientes con EM presentan síntesis intratecal de IgGs, sin embargo, no siempre se ha requerido para el diagnóstico de la enfermedad (Polman et al., 2011).

En 2001, los criterios de McDonald dieron protagonismo a la RM como prueba diagnóstica para evidenciar la actividad patológica sirviendo como prueba de

diseminación en tiempo y en espacio (McDonald et al., 2001). Finalmente, en 2017 se realizó una revisión de los criterios de McDonald en los cuales, además de la gran importancia que se le daba a la RM como prueba diagnóstica, también se les da mayor importancia a otras exploraciones complementarias como el análisis del LCR o los potenciales evocados visuales (PEV) (Thompson et al., 2018). Los PEV estudian la actividad electrofisiológica del sistema nervioso ante un estímulo visual permitiendo valorar la disfuncionalidad de las vías visuales del nervio óptico y el cerebro, aportando una corroboración adicional a la diseminación espacial que apoye el diagnóstico de EM (Songster et al., 2011).

2.2.4.- Anatomía patológica

La patología de la EM se caracteriza por la aparición de lesiones multifocales, denominadas placas, en el SNC, principalmente en el cerebro, nervio óptico y médula espinal. Las placas son zonas desmielinizadas, generalmente localizadas próximas a vénulas capilares en las cuales se ha producido una rotura de la barrera hematoencefálica (BHE). Este fenómeno permite la entrada de linfocitos T, B y macrófagos al SNC generando una inflamación y desmielinización, con la consecuente pérdida de oligodendrocitos. Al inicio de la patología, los axones y las neuronas se encuentran altamente preservados, sin embargo, a medida que la enfermedad avanza se produce una pérdida neuroaxonal gradual, que se correlaciona con la discapacidad del paciente, y una atrofia cerebral que genera un alargamiento ventricular. Además, durante el proceso de desmielinización se produce la aparición de gliosis reactiva en la cual los astrocitos forman cicatrices gliales en las lesiones desmielinizadas (Trapp and Nave, 2008; Dendrou et al., 2015).

Históricamente, se ha asociado a la EM una desmielinización de la sustancia blanca del SNC, sin embargo, diferentes estudios por RM e histopatológicos han confirmado la existencia de lesiones desmielinizantes en la sustancia gris cortical y profunda, en las cuales puede llegar a exceder a la desmielinización existente en sustancia blanca (Kutzelnigg et al., 2005) (Figura 4).

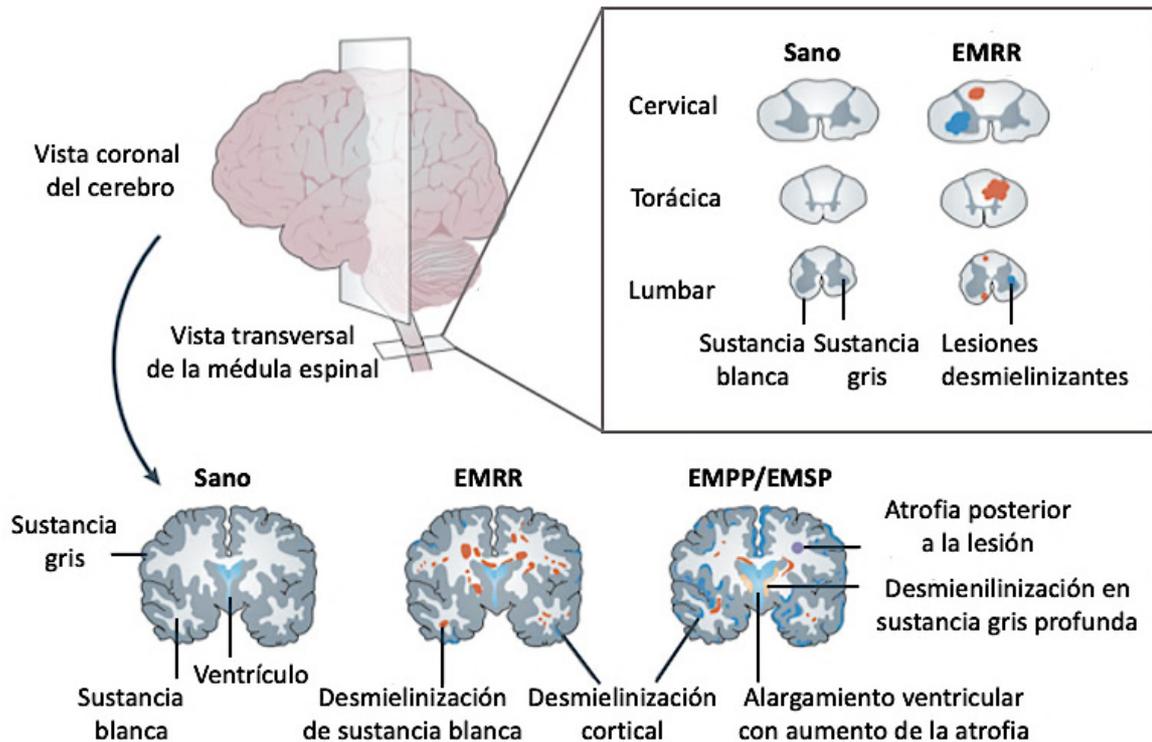


Figura 4.- Lesiones demielinizantes de la EM en el cerebro y la médula espinal. En los estadios tempranos de la patología (CIS y EMRR) predominan las lesiones activas en la sustancia blanca, mientras que en las formas progresivas (EMPP y EMSP) hay mayor presencia de lesiones inactivas en la sustancia blanca y lesiones corticales en la sustancia gris. Figura adaptada de (Dendrou et al., 2015).

2.2.4.1.- Lesiones en la sustancia blanca

Durante las etapas iniciales de la enfermedad (CIS y EMRR) son muy características las lesiones desmielinizantes activas donde se observa una alta densidad linfocítica (células T CD8⁺, células B y, en menor proporción, células T CD4⁺), microglía activada, macrófagos y astrocitos reactivos. Sin embargo, éstas son menos frecuentes en pacientes que presentan la enfermedad en un estadio progresivo (EMSP y EMPP), en los que predominan las lesiones inactivas que se caracterizan por ser hipocelulares, tener una desmielinización muy definida, una reducida densidad axonal, gliosis astrocítica, activación microglial variable y una densidad linfocítica considerablemente menor que la que presentan las lesiones activas. Sin embargo, en ambas formas progresivas de la EM se observan también lesiones activas, las cuales se correlacionan con una mayor severidad clínica de la enfermedad (Popescu et al., 2013; Frischer et al., 2015).

2.2.4.2.- Lesiones corticales en la sustancia gris

Se ha demostrado la correlación entre el daño en la sustancia gris y el déficit cognitivo que desarrollan los pacientes con EM (Curti et al., 2018). Este tipo de lesión se encuentra presente desde las etapas iniciales de la enfermedad, sin embargo, son más frecuentes en etapas avanzadas. Se cree que están producidas por mediadores pro-inflamatorios liberados directamente desde las meninges y el LCR (Magliozzi et al., 2018). Estas lesiones, comparadas con las que se producen en la sustancia blanca, cursan con una menor rotura de la BHE y un menor grado inflamatorio, además de una remielinización más eficiente, lo que sugiere que los mecanismos por los cuales se generan estas lesiones son diferentes a los que producen las lesiones en la sustancia blanca (Trapp and Nave, 2008).

2.3.- Etiología

La etiología de la EM es uno de los aspectos más estudiados de la enfermedad dado que sigue siendo una incógnita, aunque se sabe que el desarrollo de la patología es el resultado de las complejas interacciones existentes entre una susceptibilidad genética y diferentes factores ambientales de riesgo.

2.3.1.- Factores genéticos

Existe un amplio consenso en que los factores genéticos de riesgo no presentan una heredabilidad mendeliana, sino que se trata de un modelo poligénico en el cual múltiples genes polimórficos, independientes o que se encuentran interactuando entre sí, junto con alelos de riesgo comunes a nivel poblacional, pueden producir un aumento del riesgo general, ya sea pequeño o moderado (Hollenbach and Oksenberg, 2015).

Gracias a los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) se han podido identificar más de 200 variantes genéticas que pueden aumentar el riesgo de padecer EM. Entre ellas, los genes que cobran mayor importancia por presentar una asociación genética de riesgo más fuerte son aquellos que se encuentran dentro del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en el cromosoma 6, y más exactamente, aquellos

que codifican las diferentes variantes del antígeno leucocitario humano (HLA). La variante de clase II HLA-DRB1*15:01 se ha asociado fuertemente a un incremento del riesgo de padecer EM, mientras que otras variantes como las de clase I HLA-A*02 y HLA-B*44 se han asociado a la protección de desarrollar la enfermedad. Inclusive, se ha observado que la ausencia de la variante HLA-A*02 y la presencia de la HLA-DRB1*15:01 incrementa en hasta cinco veces el riesgo, mientras que aquellos que presentan la variante HLA-B*44 tienen una mayor preservación del volumen cerebral. Otros genes identificados como candidatos a un incremento del riesgo son aquellos implicados en la activación y proliferación de células T como CTLA4, IL2RA o IL7R, entre otros (IMSGC, 2019).

2.3.2.- Factores ambientales

2.3.2.1.- Vitamina D y radiación UV

Se ha demostrado que tanto los niveles de vitamina D como de radiación UV son factores protectores importantes en la EM. Dado que la conversión de la vitamina D en su forma activa depende de la radiación UV, es difícil distinguir los efectos de cada factor por separado. Sin embargo, se ha demostrado, en el modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), que la exposición a radiación UV protege de la neuroinflamación reduciendo la inflamación periférica, por una vía independiente a la vitamina D (Becklund et al., 2010). El papel protector de la vitamina D se cree que es debido a la amplitud de efectos que tiene sobre el sistema inmune, incluyendo la supresión proliferativa de las células B y T; desviando la respuesta inflamatoria hacia una de carácter regulatorio (Tregs) y promoviendo un fenotipo tolerogénico de las células dendríticas (DCs) y los monocitos (Breuer et al., 2019).

2.3.2.2.- Humo del tabaco

Un consumo acumulativo de tabaco se asocia a un incremento del riesgo a padecer EM. Una de las teorías que apoyan este hecho es la irritación pulmonar que conduciría a una respuesta Th17 (Ammitzbøll et al., 2019). El humo del tabaco también se relaciona con

un incremento del desarrollo de anticuerpos neutralizantes (NAbs) contra fármacos biológicos utilizados para el tratamiento de la EM, como el IFN β (Hedström et al., 2014b) o el Natalizumab (Hedström et al., 2014a).

2.3.2.3.- Dieta y obesidad

Anteriormente se postuló como factor de riesgo una dieta alta en sal, debido a que diversos experimentos *in vitro* demostraron que condiciones altas en sal promovían la diferenciación de las células T hacia células Th17 patogénicas y, además, ratones que ingerían una dieta alta en sal desarrollaban una EAE más severa (Kleinewietfeld et al., 2013). Sin embargo, estudios en humanos no han demostrado una relación entre la ingestión de una dieta con alto contenido en sal y la ratio de conversión de un CIS a EM, ni tampoco en la severidad de la enfermedad (Fitzgerald et al., 2017). Respecto a la obesidad, el peso durante la adolescencia parece ser crítico para el riesgo de padecer EM en la edad adulta. Aunque, dicha asociación está bien establecida, se desconoce la relación entre el índice de masa corporal y el curso clínico, aunque se cree que puede haber diversas interacciones con las diferentes variantes genéticas del HLA (Hedström et al., 2016).

2.3.2.4.- Infecciones

Uno de los agentes infecciosos que se ha vinculado más ampliamente con el aumento del riesgo a desarrollar EM, es el virus Epstein-Barr (EBV). Los pacientes con EM presentan títulos de anticuerpos más elevados contra el antígeno nuclear 1 del EBV (Sundström et al., 2009). Además, se cree que el momento de la infección es crítico, siendo durante la adolescencia cuando este riesgo es más elevado (Makhani et al., 2016). Sin embargo, otros patógenos como el citomegalovirus (CMV) se han asociado a un menor riesgo de padecer EM (Sundqvist et al., 2014). Un estudio reciente ha determinado que los individuos CMV-seropositivos presentan un menor ratio de conversión a EM tras un CIS (Makhani et al., 2016).

2.3.2.5.- Microbiota intestinal

Estudios recientes han demostrado una correlación entre la frecuencia de células Th17 intestinales con alteraciones en la microbiota y la severidad clínica de la EM (Cosorich et al., 2017). También se ha observado que las bacterias intestinales modulan las células T humanas y cuando células T de pacientes con EM son trasplantadas en ratones se produce un aumento de la severidad de la EAE (Cekanaviciute et al., 2017). Un estudio en pacientes con EM sugiere que la disbiosis microbiana, particularmente una disminución en los microorganismos con capacidad anti-inflamatoria, conduce a un aumento de la respuesta pro-inflamatoria (Miyake et al., 2015). Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que el tipo y la abundancia relativa de la microbiota puede afectar al riesgo de padecer EM y a su curso clínico.

2.4.- Inmunopatogenia

2.4.1.- Origen de la respuesta autoinmune

Los resultados arrojados por diferentes estudios genéticos, histopatológicos e inmunológicos, realizados con modelos animales y pacientes con EM, han permitido conocer el papel clave que desempeña el sistema inmune en la patología. Sin embargo, aún no se ha llegado a esclarecer donde ocurre el primer evento autoinmune que se genera contra antígenos propios del SNC y que acaba desencadenando la EM.

Existen dos hipótesis que intentan explicar el origen de la respuesta autoinmune. El modelo intrínseco defiende que el evento autoinmune inicial tiene lugar en el interior del SNC, produciéndose una liberación sistémica de antígenos neuronales, lo cual en un contexto de ambiente pro-inflamatorio acaba generando una respuesta autoinmune dirigida contra los autoantígenos provenientes del SNC. Esta hipótesis se encuentra respaldada por un estudio en el cual se administraban proteínas mielínicas en el cerebro y LCR de animales, desencadenándose una respuesta humoral y celular en periferia y pudiéndose detectar péptidos derivados de las proteínas administradas en los ganglios linfáticos cervicales (Cohen and Rudick, 2011). Por otro lado, el modelo extrínseco sugiere que la respuesta autoinmune inicial contra antígenos propios del SNC tiene lugar

a nivel periférico en un contexto inflamatorio, por ejemplo, ocasionado por la infección de un agente patógeno. Es esta última hipótesis la más aceptada y la que guardaría más similitud con el modelo de EAE al cual se le induce la autoinmunidad vía sistémica. En cualquiera de los dos casos, se produciría una amplificación de la respuesta autoinmune periférica dirigida contra nuevos autoantígenos encefalitogénicos que acabarían con una infiltración linfocitaria masiva en el SNC (Hemmer et al., 2015; Sospedra and Martin, 2016; Thompson et al., 2018).

2.4.1.1.- Infecciones y autoinmunidad periférica

El mecanismo por el cual se produce la activación de células T autorreactivas en periferia sigue siendo objeto de debate. Sin embargo, existen diversas hipótesis que intentan dar respuesta a la vinculación entre la infección por agentes patógenos con el desarrollo de la patología autoinmune.

La primera hipótesis se basa en el mimetismo molecular, total o parcial, de ciertos antígenos procedentes de agentes patógenos con antígenos propios del SNC, los cuales son capaces de activar las células autorreactivas por reactividad cruzada al ser presentados a estas células por las células presentadoras de antígeno (APCs) (Sospedra and Martin, 2006). Otra hipótesis que se plantea es la activación secundaria de células autorreactivas, la cual defiende que ciertas infecciones virales son capaces de desencadenar la activación masiva de APCs y un ambiente pro-inflamatorio idóneo para que se de la activación de células T autorreactivas (Fujinami et al., 2006).

Sin embargo, la hipótesis que cobra más fuerza es la combinación de las dos anteriores, por la cual, si un patógeno viral presenta mimetismo molecular con antígenos del SNC, se puede producir una pre-activación de células T autorreactivas. Por otro lado, ciertas infecciones de patógenos irrelevantes son capaces de generar una respuesta que implica la activación de células *natural killer* (NK), *natural killer* T (NKT) y DCs, con la consecuente producción de IL-12 e IFN γ . Este ambiente pro-inflamatorio sería capaz de reactivar las células T que habían sido pre-activadas por el fenómeno de mimetismo molecular (McCoy et al., 2006).

2.4.1.2.- Potenciales antígenos del SNC

La característica histopatológica más relevante de la EM es la desmielinización del SNC, por lo que la mayoría de los estudios realizados para poder identificar los principales antígenos, se han centrado en los componentes de la vaina de mielina. Gracias al modelo murino de EAE y a muestras de suero y LCR de pacientes con EM ha podido identificarse a las glicoproteínas que componen la mielina como potenciales antígenos diana de células T autorreactivas y autoanticuerpos. Estas glicoproteínas clave son: la proteína proteolipídica (PLP), la glicoproteína mielínica de oligodendrocitos (MOG), la proteína básica asociada a mielina de oligodendrocitos (MOBP), la glicoproteína asociada a mielina (MAG), la proteína básica de la mielina (MBP) y la proteína específica de oligodendrocitos (OSP) (Schmidt, 1999; Schirmer et al., 2014) (Figura 5).

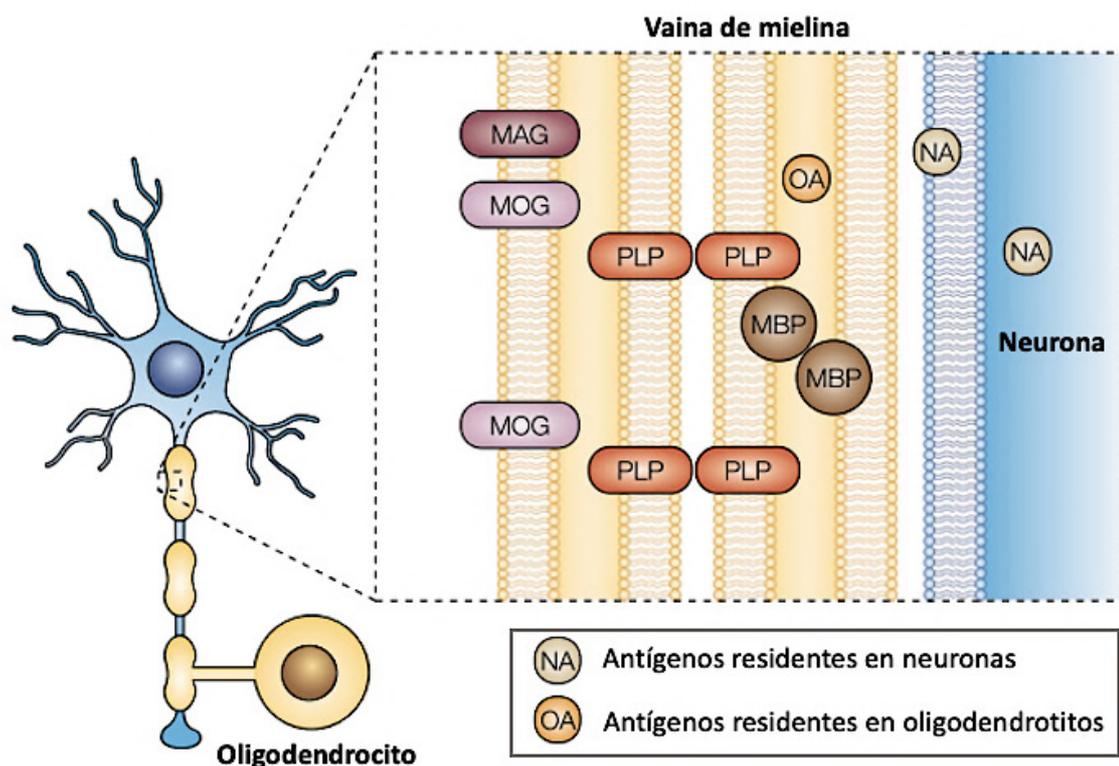


Figura 5.- Principales glicoproteínas de la vaina de mielina. Diversos componentes neuronales y de oligodendrocitos han sido identificados como antígenos potenciales de células autorreactivas y autoanticuerpos. Figura adaptada de (Hemmer et al., 2002).

También han sido reconocidos como potenciales antígenos, los lípidos componentes de la mielina como los esfingolípidos (Kanter et al., 2006), proteínas axonales como los neurofilamentos (Quintana et al., 2012), proteínas astrocíticas como la S100 β (Schmidt

et al., 1997) y el KIR4.1 (Srivastava et al., 2012) o proteínas asociadas a la inflamación como la proteína de choque térmico Hsp70 (Quintana et al., 2012).

2.4.2.- Principales componentes celulares de la respuesta inflamatoria

Inicialmente se consideraba que los brotes inflamatorios de la EM estaban únicamente mediados por células T, sin embargo, hoy la inmunopatogenia de la EM se entiende como un conjunto de interacciones bidireccionales entre los diferentes componentes del sistema inmune, que incluye a células T, células B y células mieloides en periferia y células residentes del SNC, como la microglía y los astrocitos. De manera que, las células residentes del SNC junto con las células inmunes de la periferia serían las responsables de la respuesta inflamatoria que se produce en la EM (Filippi et al., 2018).

2.4.2.1.- Células T

Células T efectoras

Según el modelo extrínseco, la EM se origina debido a una activación periférica de células T CD4⁺ autorreactivas que son capaces de migrar hasta el SNC y una vez ahí sufrir una reactivación por las APCs, reclutándose nuevas células T efectoras y macrófagos estableciéndose así la lesión inflamatoria (Traugott et al., 1983; Hauser et al., 1986; Malpass, 2012).

Las células T CD4⁺ efectoras se encuentran localizadas en el interior de las lesiones inflamatorias del SNC y en el LCR de pacientes con EM (Traugott et al., 1983). Inicialmente, se apoyaba que la inducción por IL-12 de la respuesta Th1, productora de elevados niveles de IFN γ , era la causante principal de la EAE (Tada et al., 1978). Sin embargo, una vez se identificó al subtipo celular Th17 (productor principal de la IL-17), como el eje central de la autoinmunidad, se consideró que la IL-17 y el IFN γ eran las principales moléculas causantes del inicio de la respuesta patogénica (Bettelli et al., 2006). Recientemente se ha demostrado que las células T CD4⁺ productoras de IL-17 pueden tener o no un fenotipo patogénico. La subpoblación Th17 con función encefalitogénica son aquellas que expresan TNF α , IL-22 e IL-21 en altos niveles

(Gaublomme et al., 2015), mientras que aquellas que expresan altos niveles de IL-10 se les ha asociado un fenotipo no patogénico (Lee et al., 2012). Inclusive, en las lesiones inflamatorias se han encontrado células T CD4⁺ con un fenotipo intermedio Th1/Th17 capaces de expresar de manera simultánea IFN γ e IL-17. (Kebir et al., 2009)

El papel del IFN γ es controvertido, ya que a pesar de que la administración exógena en el modelo EAE parecía tener un efecto protector (Furlan et al., 2001; Berghmans et al., 2006), un estudio en humanos realizado en 1987 produjo una exacerbación de la patología (Panitch et al., 1987). Esto puede deberse a las diferencias inmunológicas existentes entre el ratón y el humano, por ejemplo, en el modelo de EAE la IL-23 es crítica para la inducción de la respuesta mediada por Th17, mientras que no es así en humanos (Ghoreschi et al., 2010; Zielinski et al., 2012). En el caso de la IL-17 no existen resultados contradictorios ya que tanto ensayos clínicos en humanos (Havrdová et al., 2016) como estudios de transferencia pasiva en el modelo de EAE (Luger et al., 2008) han corroborado el papel patogénico de la citoquina.

Recientemente ha sido identificado un nuevo subtipo de células T CD4⁺ denominado Th9, caracterizado por una potente secreción de IL-9. Aunque el papel patogénico de estas células aún no está claro, se ha observado que son capaces de generar inflamación y contribuir a la severidad de la EAE, mientras que ratones *knock-out* (KO) para la IL-9 se encuentran protegidos frente al desarrollo de la enfermedad. Por lo que se cree que este subtipo celular, junto con las respuestas Th1 y Th17, contribuye a la respuesta pro-inflamatoria de la EM (Deng et al., 2017).

Aunque históricamente se le ha adjudicado el papel encefalitogénico a las células T CD4⁺ autorreactivas, las células T CD8⁺ efectoras parecen tener un papel importante en la patología. Además, a diferencia de lo que ocurre en el modelo de EAE, en humanos la cantidad de células T CD8⁺ es superior a la de T CD4⁺ tanto en lesiones de la sustancia blanca como en las lesiones corticales de la sustancia gris, correlacionándose su frecuencia con el daño axonal (Traugott et al., 1983; Frischer et al., 2009). Un estudio de caracterización realizado con células T CD8⁺ aisladas del SNC de pacientes exhibieron

una expansión oligoclonal indicando que su amplificación se debe a respuestas antígeno-específicas (Jacobsen et al., 2002).

Las células T CD8⁺ son capaces de reconocer péptidos mielínicos presentados por el MHC I y eliminar por citotoxicidad a las células productoras de mielina mediante la liberación de granzimas de tipo A y B (Barry and Bleackley, 2002), cuyos niveles se encuentran incrementados en el LCR de pacientes con patología activa respecto a pacientes en remisión (Malmeström et al., 2008). Algunas de estas células T CD8⁺ también son capaces de secretar IFN γ e IL-17, lo cual contribuye aún más al desarrollo de la patología inflamatoria (Huber et al., 2013). Sin embargo, también existen células T CD8⁺ que se caracterizan por la expresión en superficie de CD122, CD28 y CD103, las cuales ejercen un papel supresor (Lu et al., 2016). Estudios en pacientes demostraron que estas células T CD8⁺ presentaban una menor capacidad supresora durante las recaídas inflamatorias (Baughman et al., 2011), sin embargo, en pacientes tratados con acetato de glatirámero la capacidad supresora se veía incrementada (Tennakoon et al., 2006). Por lo que el papel que desempeñan las células T CD8⁺ en la enfermedad puede ser tanto patogénico como beneficioso.

Células T reguladoras

Las células Tregs, con un fenotipo CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺, son el principal componente supresor capaz de modular la respuesta inflamatoria, mantener la autotolerancia y prevenir la autoinmunidad mediante diversas vías, algunas de las cuales implican el contacto directo con las células efectoras. Diversos estudios han demostrado que durante el proceso inflamatorio la capacidad supresora de las Tregs se ve comprometida detectándose que durante el pico clínico de la EAE, coexiste un elevado número de Tregs disfuncionales con células T efectoras en el SNC de los animales (O'Connor et al., 2007). Un fenómeno similar ocurre cuando se cultivan simultáneamente células T efectoras con Tregs procedentes de pacientes con EM. Sin embargo, la frecuencia en sangre de Tregs no se encuentra disminuida en pacientes con EM, por lo que se cree que no se trata de un problema de cantidad sino de capacidad supresora (Haas et al., 2005). Otro estudio que complementa este hallazgo es la detección de niveles bajos tanto de expresión

como proteicos de Foxp3 en pacientes con EM, especialmente en aquellos que presentan la forma clínica RR, mientras que los niveles se normalizan durante la fase progresiva, lo que refuerza el hecho de que es durante la fase inflamatoria aguda donde se produce la disfuncionalidad de las Tregs (Zozulya and Wiendl, 2008). Se hipotetiza que la IL-6 es la principal causante de este hecho, ya que es capaz de inducir la diferenciación a células Th17 a expensas de las células Tregs (Kimura and Kishimoto, 2010) y puede realizar una inhibición directa de la actividad de las células Tregs (Bhela et al., 2015). Estudios recientes demuestran que el fallo en el control de la inflamación no se debe únicamente a la reducida capacidad supresora de las células Tregs, sino también a que las células T efectoras presentan una mayor resistencia a esta supresión (Schneider et al., 2013; Bhela et al., 2015).

Por otro lado, en 1997 se descubrió un nuevo subtipo de células Tregs a las que se les denominó Tr1 (Groux et al., 1997). Estas células se caracterizan por co-expresar CD49b y LAG3 en superficie (Gagliani et al., 2013), además de producir niveles elevados de IL-10 (Groux et al., 1997). Similar a lo que ocurre con las células Tregs clásicas, también se ha observado que los pacientes con EM presentan Tr1 disfuncionales que expresan niveles de IL-10 significativamente menores a los detectados en individuos sanos (Astier et al., 2006).

2.4.2.2.- Células B

Las células B también tienen un papel fundamental en la patogenia de la EM debido a su capacidad secretora de anticuerpos y citoquinas y a su función como APCs. La aparición de bandas oligoclonales en el LCR debidas a la síntesis intratecal de IgG, es consistente en el 95% de los pacientes con EM. Sin embargo, la disminución de la frecuencia de recaídas observadas mediante el tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-CD20 (molécula de superficie específica de células B), no va acompañada de un cambio en el perfil de inmunoglobulinas del LCR de los pacientes, lo que sugiere que las células B no ejercen su papel patogénico durante los brotes inflamatorios mediante la producción de autoanticuerpos (Cross et al., 2006), sino que es debido a su capacidad de secretar ciertas citoquinas y actuar como APCs, activando así a las células T efectoras. Los

pacientes con EM tienen incrementado un subtipo de células B de fenotipo pro-inflamatorio que se caracteriza por la secreción de altos niveles de GM-CSF, TNF α e IL-6, siendo capaces así de producir una activación de las respuestas Th1, Th17 y de células mieloides pro-inflamatorias, responsables de los brotes inflamatorios. Además, el tratamiento con anti-CD20 es capaz de reducir las respuestas pro-inflamatorias Th1, Th17 y células mieloides periféricas. Sin embargo, tras la interrupción del tratamiento, las células B que resurgen presentan un perfil anti-inflamatorio caracterizado por la secreción de IL-10, denominadas células B reguladoras (Bregs), lo que parece indicar que el balance entre células B anti- y pro-inflamatorias es importante en las recaídas de la enfermedad (Bar-Or et al., 2010; Barr et al., 2012; Li et al., 2015).

2.4.2.3.- Macrófagos y microglía

Los fagocitos mononucleares, como los macrófagos y la microglía, son abundantes en las lesiones del SNC tanto en la fase de brotes como en la fase progresiva de la enfermedad. Estas células son capaces de interactuar con células del sistema inmune adaptativo y causar un daño tisular neuroinflamatorio de manera directa, lo cual se ha demostrado mediante diferentes evidencias histopatológicas que detectan una colocalización de estos tipos celulares con células T en zonas de desmielinización y de daño oxidativo del SNC de pacientes con EM (Haider et al., 2011) y en el modelo de EAE (Greter et al., 2005).

Tanto los macrófagos como la microglía pueden subdividirse en dos fenotipos: M1 y M2. Las células M1 se caracterizan por tener un perfil pro-inflamatorio debido a la secreción de IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF α e iNOS (sintasa del óxido nítrico inducible), moléculas capaces de producir una activación de las respuestas pro-inflamatorias del sistema inmune adaptativo y generar daño oxidativo directo (Mosser and Edwards, 2008). Se cree que la actividad patogénica de las células M1 también se debe a su capacidad de actuar como APCs activadoras de las células T gracias a la expresión de MHC II, CD40, CD80 y CD86 (Windhagen et al., 1995; Zrzavy et al., 2017), aunque algunos estudios creen que esta capacidad es limitada y predomina su función secretora (Mack et al., 2003). Por otro lado, las células M2 se caracterizan por tener un fenotipo anti-inflamatorio debido a la

secreción de IL-10 y TFG β (Mosser and Edwards, 2008). Durante el pico inflamatorio las células M1 son las más abundantes, sin embargo, en la fase de remisión se produce una polarización hacia un fenotipo M2, necesario para una eficiente remielinización (Miron et al., 2013).

2.4.2.4.- Astrocitos

Los astrocitos son la población celular más abundante del SNC la cual juega un papel crucial en la homeostasis, ya que en una situación fisiológica los astrocitos contribuyen a la formación e integridad de la BHE, regulan el crecimiento axonal, dan soporte a las neuronas y controlan la formación y la actividad de las conexiones sinápticas (Clarke and Barres, 2013). Sin embargo, cuando se da una situación inflamatoria en el SNC, como en la EM, los astrocitos se activan produciéndose una serie de cambios derivados de la astrogliosis reactiva. La activación astrogliosa comienza en una etapa muy temprana, incluso antes de que se produzca la infiltración linfocitaria, debido a factores inflamatorios que atraviesan la BHE y entran al parénquima del SNC (Chanaday and Roth, 2016).

Los astrocitos juegan tanto un papel patogénico como protector en la patogenia de la EM. Su papel patogénico está asociado a un incremento de la expresión de genes relevantes en la presentación antigénica, estrés oxidativo y rotura de la BHE, mientras que la expresión de factores protectores como neurotrofinas, críticos para la supervivencia neuronal, se encuentra disminuida (Falsig et al., 2006). Sin embargo, se ha observado, en ratones, que la ausencia de astrocitos reactivos conlleva un aumento de la severidad de la EAE (Toft-Hansen et al., 2011), indicando que los astrocitos juegan también un papel protector en la restauración de la integridad de la BHE, la supresión de la inflamación, ayudan a la remielinización y a la regeneración axonal así como a la protección neuronal (Yi et al., 2019).

2.4.3.- Etapas del proceso inflamatorio

2.4.3.1.- Permeabilización de la BHE y formación del foco inflamatorio

La permeabilización de la BHE es una etapa clave para la generación de las lesiones inflamatorias del SNC, debido a que la permeabilización vascular aberrante precede al fenómeno desmielinizante tanto en la EAE como en la EM. Se cree que una vez las células T autorreactivas periféricas acceden al espacio subaracnoideo, a través del LCR del plexo coroideo, éstas pueden sufrir una reactivación por las APCs residentes del SNC, como los macrófagos perivasculares y la microglía (Greter et al., 2005; Heppner et al., 2005; Kivisakk et al., 2009). Una vez producida la reactivación, las células T comienzan a liberar ciertas citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas provocando que la BHE se active y exprese moléculas de adhesión, como ICAM-1 y VCAM-1, que permitirán la migración masiva de nuevas células T periféricas a través de la BHE gracias a la unión con sus respectivos ligandos, las integrinas LFA-1 y VLA-4 (Sonar and Lal, 2017). Un tratamiento para la EM ampliamente utilizado desde 2006 es un anticuerpo anti-VLA4 (Natalizumab), el cual disminuye el infiltrado inflamatorio en el SNC, previniendo del desarrollo de la EAE (Baron et al., 1993). Este tratamiento en humanos reduce sustancialmente la incidencia de brotes inflamatorios frenando la progresión de la enfermedad (Polman et al., 2006). Estudios experimentales en animales han demostrado que las células T CCR6⁺ son capaces de migrar desde los órganos linfoides secundarios hasta el SNC a través del plexo coroideo (Ransohoff and Engelhardt, 2012) (Figura 6).

Una vez los linfocitos T han atravesado la BHE son capaces de penetrar a través de la membrana basal endotelial gracias a la α 4-laminina que promueve la diapédesis de las células T infiltradas. Posteriormente, mediante la liberación de citoquinas y quimioquinas, las células T son capaces de atraer monocitos, DCs y de inducir la liberación de metaloproteasas (MMP2, MMP7, MMP8 y MMP9) por los macrófagos residentes en las meninges. Estas metaloproteasas son las causantes de la rotura de la matriz extracelular, permitiendo la migración de las células T reactivas a través de la glía y facilitando la formación del foco inflamatorio inicial (Greter et al., 2005; Heppner et al., 2005; Schreiber et al., 2007; Bartholomäus et al., 2009).

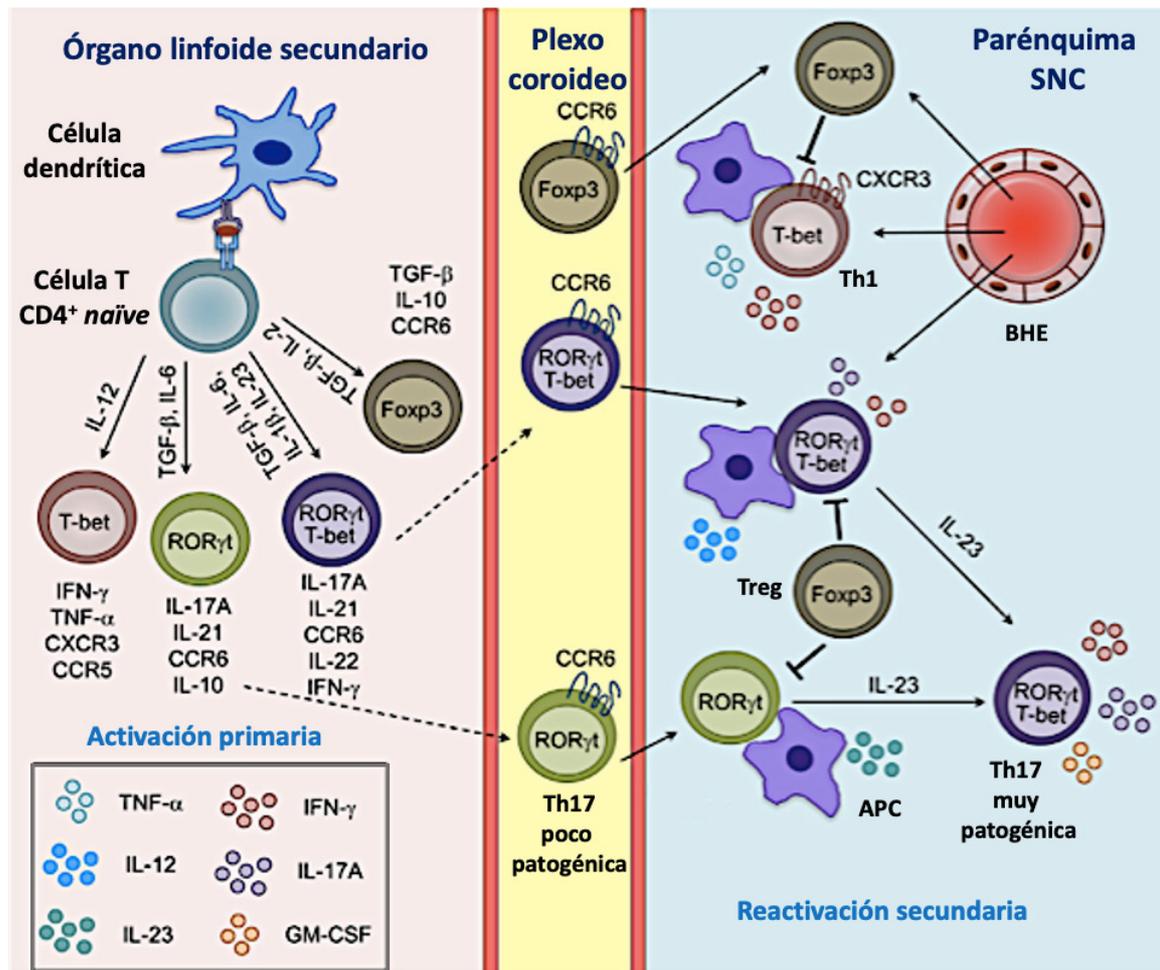


Figura 6.- Generación de las respuestas efectoras Th1/Th17, reguladora de células Tregs e infiltración en el SNC. Las células T sufren una primera activación en los órganos linfoides secundarios en periferia tras la presentación antigénica y diversos estímulos de citoquinas. Las células Th17 migran hacia el SNC principalmente a través del plexo coroideo gracias al CCR6, mientras que las células Th1 lo hacen preferiblemente por la BHE gracias al CXCR3. En el SNC las células patógenas son reactivadas por las APCs locales provocando la liberación de citoquinas pro-inflamatorias que junto a la acción de macrófagos y microglía generarán la formación del foco inflamatorio. Figura adaptada de (Sonar and Lal, 2017).

2.4.3.2.- Degeneración neuroaxonal

Tanto el proceso desmielinizante como el neurodegenerativo se producen tanto durante la fase RR como la fase progresiva de la enfermedad. El infiltrado inflamatorio del SNC es capaz de secretar diversos elementos neurotóxicos como especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS), glutamato, citoquinas y quimioquinas que son capaces de producir una alteración metabólica de las células del SNC, incluyendo a las neuronas y sus axones (Sospedra and Martin, 2016).

El daño generado por las ROS y RNS, secretadas principalmente por la microglía y los macrófagos activados, se debe probablemente a que estas especies reactivas son capaces de generar mutaciones mitocondriales que acaban desencadenando un estrés metabólico, mal plegamiento de proteínas, deficiencia energética y pérdida de la actividad neuronal (Haider et al., 2011). Diversos canales iónicos neuronales sufren una redistribución a lo largo de los axones desmielinizados en un intento compensatorio de mantener la homeostásis iónica, sin embargo, este hecho sumado a un aumento de los niveles de glutamato promueve un desequilibrio iónico que genera aún más daño neuronal capaz de extenderse hasta el soma neuronal, el axón terminal e incluso hasta las neuronas adyacentes desencadenando su apoptosis (Craner et al., 2004).

Durante la fase progresiva de la EM, el papel patogénico del sistema inmune adaptativo se va haciendo cada vez menos presente, manteniéndose una degeneración neuroaxonal ocasionada por la respuesta inmune local del SNC de la microglía y los macrófagos, siendo las alteraciones metabólicas secundarias las causantes de la neurodegeneración que produce el empeoramiento clínico progresivo (Mahad et al., 2015).

2.4.3.3.- Remielinización del SNC

La remielinización se ha sugerido como un mecanismo de recuperación tras un brote inflamatorio dado que se ha observado que puede ocurrir de manera natural en la EM. Las placas remielinizantes se caracterizan por presentar una remielinización irregular o global con axones mielinizados de pequeño grosor. Este fenómeno ocurre en dos fases: la primera consiste en una colonización de las lesiones por las células progenitoras de oligodendrocitos (OPCs), mientras que en la segunda las OPCs se diferencian a oligodendrocitos mielinizantes que entran en contacto con los axones desmielinizados para volver a formar vainas de mielina funcionales (Albert et al., 2007; Chari, 2007; Franklin and Ffrench-Constant, 2008) (Figura 7).

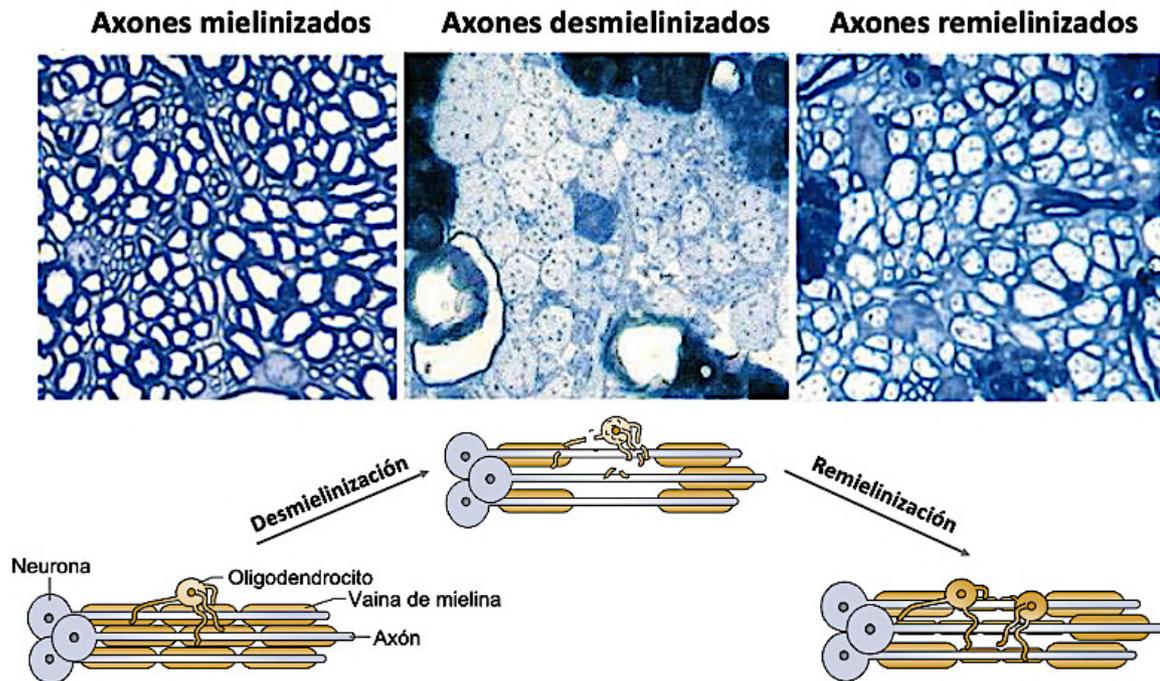


Figura 7.- Fenómeno de desmielinización y remielinización de los axones neuronales. Las imágenes pertenecen a secciones transversales de la sustancia blanca cerebelosa de una rata adulta, las cuales, de izquierda a derecha, muestran axones mielinizados de varios diámetros, axones desmielinizados (con macrófagos llenos de restos miélinicos) y axones con vainas de mielina finas tras la remielinización. Figura adaptada de (Sawcer et al., 2014).

La variabilidad en el proceso de remielinización depende de varios factores que incluyen la edad del paciente, duración de la enfermedad, localización de la lesión, presencia de OPCs e integridad axonal. Durante las etapas tempranas de la EM y en pacientes jóvenes se produce una remielinización sustancial, mientras que es prácticamente ausente en las formas progresivas de la enfermedad (Goldschmidt et al., 2009).

2.5.- Tratamientos actuales

La EM actualmente no tiene cura, sin embargo, a partir de los años 90 se comenzaron a comercializar diversos fármacos destinados a la regulación del proceso inflamatorio. Los tratamientos actuales de la EM pueden clasificarse en función de tres líneas de actuación: tratamientos de la sintomatología clínica, tratamientos de los brotes inflamatorios y tratamientos modificadores de la enfermedad, siendo éstos últimos los capaces de ejercer una regulación sobre el sistema inmune a largo plazo.

Diversos fármacos se emplean para tratar los síntomas clínicos de la EM, como el deterioro de la capacidad para caminar, la espasticidad muscular, el dolor crónico, la pérdida del control intestinal y urinario y los síntomas neuropsiquiátricos. Entre los más usados se encuentra la dalfampridina, un antagonista de un canal de potasio capaz de mejorar la transmisión del impulso nervioso a través de axones desmielinizados permitiendo cierta mejora en la capacidad motora. Otro tratamiento ampliamente utilizado es la administración de nabiximoles para tratar la espasticidad muscular (Filippi et al., 2018). En el caso de los brotes inflamatorios, altas dosis de corticosteroides como la prednisona, la metilprednisolona o la dexametasona son los únicos fármacos recomendados capaces de acelerar la entrada en fase de remisión, sin embargo, no presentan ningún efecto sobre el curso clínico de la enfermedad a largo plazo (Filippini et al., 2000).

2.5.1.- Tratamientos modificadores de la enfermedad para la EMRR

La aparición de estas terapias supuso una revolución en el tratamiento de la EM, dado que eran los primeros fármacos capaces de ejercer una regulación directa de los procesos inflamatorios observándose con todos ellos una reducción del número de brotes, sin embargo, aquellos que presentan mayor efectividad también suelen tener asociados efectos secundarios más severos. Es por esto por lo que los tratamientos modificadores se categorizan como de primera o segunda línea. Los fármacos de primera línea tienen una efectividad moderada, pero presentan un perfil de seguridad favorable, por lo que se prescriben a pacientes que presentan formas leves de la enfermedad. Mientras que los fármacos de segunda línea son altamente eficaces, pero al tener efectos secundarios más severos se prescriben a pacientes con una patología severa o que no responden a los de primera línea (Lewis and Spillane, 2019).

2.5.1.1.- Tratamientos de primera línea

A este grupo pertenecen los primeros fármacos inyectables surgidos en los años 90, el acetato de glatirámico y los IFN β . El acetato de glatirámico es una mezcla de aminoácidos de ácido glutámico, lisina, alanina y tirosina capaces de unirse al MHC e

incrementar los niveles de IL-10, IL-4, TGF β y las células T CD8⁺ reguladoras. A la familia de los interferones pertenecen el IFN β -1a e IFN β -1b, los cuales actúan como inhibidores proliferativos de las células T y evitan su migración al SNC. En 2014 la EMA aprobó el tratamiento con IFN β -1a pegilado, una variante de la citoquina nativa que contiene una modificación química que incrementa su vida media. Estos tratamientos tienen asociados efectos secundarios leves como reacciones en el sitio de inyección, pero su efectividad es moderada con una capacidad de reducción de los brotes de un 30% (Scott, 2013; Jakimovski et al., 2018).

Como tratamientos orales de primera línea se encuentran la Teriflunomida y el Dimetilfumarato, aprobados por la EMA en 2012 y 2014 respectivamente. La Teriflunomida es un inhibidor de la presentación antigénica entre las APCs y las células T capaz de reducir la ratio anual de brotes un 34%. Uno de sus principales efectos secundarios es la toxicidad hepática (Confavreux et al., 2014). Por otro lado, el Dimetilfumarato es un activador de la vía transcripcional Nrf2 que consigue reducir la aparición de nuevos brotes un 49%. Suele tener efectos secundarios leves, sin embargo, se han reportado infecciones severas derivadas de la depleción del número de linfocitos (Bomprezzi, 2015).

2.5.1.2.- Tratamientos de segunda línea

A esta categoría pertenece uno de los fármacos más efectivos existentes para el tratamiento de la EM, el Natalizumab, aprobado por la EMA en 2006. Como se ha comentado anteriormente, se trata de un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra la integrina VLA-4 que evita la infiltración de las células T al SNC. Mediante una administración intravenosa (i.v) mensual es capaz de reducir la ratio anual de brotes un 69%. El efecto secundario más severo asociado a este tratamiento es el desarrollo de una leucoencefalopatía multifocal progresiva ocasionada por el virus John Cunningham (Warnke et al., 2010).

Otro fármaco ampliamente usado es el Fingolimod, aprobado en 2011, una molécula capaz de unirse al receptor 1-fosfato de la esfingosina haciendo que los linfocitos

queden secuestrados en los ganglios linfáticos. Presenta una tasa de reducción de la ratio de brotes anuales de un 54%. El edema macular y la bradicardia se encuentran entre los efectos secundarios que puede generar este fármaco oral (Derfuss et al., 2016). A finales de 2019 se aprobó el tratamiento con un análogo del Fingolimod, denominado Siponimod, convirtiéndose en el primer fármaco oral prescrito tanto para pacientes con EMRR como con EMSP (Colombo et al., 2020).

En 2018 fue aprobado el tratamiento con Ocrelizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra la molécula de superficie CD20 presente en las células B. Mediante la depleción de células B se consigue una reducción de la ratio de brotes un 45%, sin embargo, su tratamiento puede generar hepatotoxicidad, por lo que está contraindicado para pacientes con hepatitis B (Stahnke and Holt, 2018).

Otros fármacos de segunda línea, capaces de reducir la ratio de brotes entre un 50 y un 60% son: la Mitoxantrona (inhibidor de la reparación del DNA), el Alemtuzumab (anti-CD52, molécula expresada en células T y B) y la Cladribina (análogo sintético de purinas que provoca la depleción de células T y B por apoptosis) (Havrdova et al., 2015; Holmøy et al., 2017; Najafian et al., 2019).

2.5.2.- Tratamientos de las formas progresivas de EM

A diferencia de lo que ocurre con la EMRR, hasta hace relativamente pocos años no había disponibles tratamientos para las formas progresivas de la enfermedad. Sin embargo, en un ensayo clínico realizado en 2017 con el tratamiento Ocrelizumab (anti-CD20), prescrito para el tratamiento de la EMRR, se observó que era capaz de reducir la progresión clínica y radiológica de la EMPP (Montalban et al., 2017). Otro fármaco que se ha observado que atenúa el riesgo de progresión, con un efecto importante en aquellos pacientes con EMSP activa es el Siponimod (Colombo et al., 2020). Los diferentes estudios indican que los fármacos modificadores que actúan sobre el sistema inmune adaptativo tienen una eficacia reducida en las formas progresivas, por lo que el tratamiento efectivo para estas formas clínicas dependerá del tratamiento

temprano del proceso inflamatorio en el SNC y de los enfoques terapéuticos no inmunes dirigidos al tratamiento de la degeneración neuroaxonal (Baecher-Allan et al., 2018).

2.6.- Encefalomiелitis autoinmune experimental

Los modelos animales de EM tienen un papel fundamental a la hora de aclarar los mecanismos patogénicos de la enfermedad y en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Se pueden diferenciar tres grandes categorías de modelos animales: los inducidos por virus, los inducidos por toxinas y los inmunomediados.

Los modelos inducidos por virus corroboran la hipótesis de que algunos factores ambientales, como las infecciones virales, están involucrados en el desarrollo de la patología. El modelo murino más conocido es el inducido con el virus de la encefalomiелitis murina de Theiler (TMEV), el cual es capaz de generar una patología desmielinizante en cepas murinas susceptibles a la infección intracerebral por este patógeno (Dal Canto et al., 1996). Por otro lado, los modelos inducidos por toxinas son interesantes a la hora de evaluar los procesos de desmielinización y remielinización en relativa ausencia de células inmunes. Se conocen varios agentes capaces de generar una desmielinización focalizada al ser administrados directamente en la sustancia blanca como la lisolecitina o sistémicamente como la cuprizona (Woodruff and Franklin, 1999). Sin embargo, el modelo inmunomediado de la EAE es, de lejos, el modelo animal más utilizado para el estudio de los aspectos relacionados con la autoinmunidad de la EM.

El modelo de EAE es uno de los más antiguos, descubierto en 1930 por Rivers y colaboradores (Rivers and Schwentker, 1935) mientras investigaban las complicaciones neurológicas de una vacuna contra la rabia en monos. Se considera que es el modelo que mejor imita el proceso de ataque al SNC que se produce en la EM, simulando varias características inmunológicas e histopatológicas clave (Baker and Amor, 2014).

2.6.1.- Inducción de la EAE

La EAE se basa en la generación inducida de una respuesta autoinmune contra antígenos presentes en las vainas de mielina de los axones, a diferencia del modelo transgénico que es capaz de desarrollar la patología de manera espontánea. La EAE puede ser inducida por dos vías: mediante una inmunización activa con antígenos mielínicos como MPB, PLP, MOG o con homogenizados del SNC (EAE activa) o bien mediante la transferencia de células T encefalitogénicas (EAE pasiva) (Robinson et al., 2014).

Para inducir activamente la EAE se realiza una inmunización subcutánea con antígenos mielínicos emulsionados en adyuvante completo de Freund (CFA), el cual contiene *Mycobacterium tuberculosis* inactivada para incrementar la respuesta inflamatoria. La inducción de la enfermedad también precisa de la administración de toxina pertussis el día de la inmunización y tras 48 horas (Constantinescu et al., 2011). La aportación exacta de la toxina pertussis a la EAE no es clara, pero se cree que favorece la entrada de las células inmunes al SNC, rompe la tolerancia de células T y promueve su proliferación y producción de citoquinas (Waldner et al., 2004). Por otro lado, la inducción pasiva de la EAE se basa en la transferencia de células T CD4⁺ autorreactivas procedentes de ratones enfermos a ratones sanos, lo cual pone de manifiesto el papel central que tiene este tipo celular en la patogenia de la enfermedad. Este modelo es muy útil para el estudio de la fase efectora en ausencia de adyuvante. Además, al poder estimular previamente las células *in vitro* con diversas citoquinas se puede estudiar el papel de las diferentes subpoblaciones de células T en la patología (Constantinescu et al., 2011).

2.6.2.- Curso clínico

Los diferentes modelos de EAE pueden simular los distintos cursos clínicos de la enfermedad humana. En función de la especie, cepa y antígeno encefalitogénico utilizado se desarrollan los diferentes modelos de EAE. Por ejemplo, si se realiza una inmunización con MBP en las cepas de rata Lewis y Dark Agouti, se produce una EAE monofásica, la cual se caracteriza por la aparición de un único brote inflamatorio (Stepaniak et al., 1997; Lenz et al., 1999). Para reproducir la EMRR se suele utilizar la

cepa de ratón SJL, la cual al ser inmunizada con PLP desarrolla una EAE crónica remitente-recurrente en la cual se producen dos o más episodios clínicos. La cepa de ratón C57BL/6J puede desarrollar también una EAE remitente-recurrente al ser inmunizada con una dosis baja de MOG o bien desarrollar una EAE crónica progresiva con ausencia de remisiones al ser inmunizada con una dosis alta de MOG (Procaccini et al., 2015). La inmunización conlleva la generación de la respuesta autoinmune contra el antígeno encefalitogénico seleccionado hasta que tras varios días aparecen los primeros síntomas clínicos de la EAE cuya progresión se trata de una parálisis ascendente. En el inicio de la patología, los animales experimentan debilidad en la cola, la cual progresa hasta las extremidades posteriores generando una paraparesia o paraplejía, hasta acabar afectando a las extremidades anteriores, lo que supone una tetraparesia o tetraplejía del animal. Ocasionalmente el animal puede morir tras haber desarrollado una patología severa. La disfunción de la capacidad motora del animal va acompañada de una significativa pérdida de peso, principalmente en la fase aguda, que acaba estabilizándose e incluso recuperándose (Moreno et al., 2012) (Figura 8).

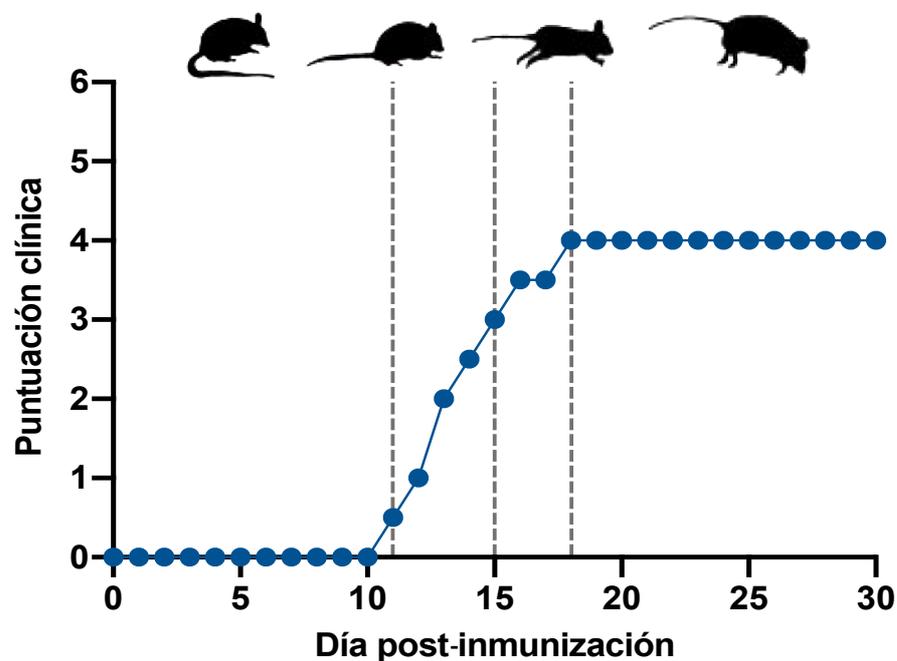


Figura 8.- Ejemplo de progresión clínica de una EAE crónica progresiva de la cepa C57BL/6J inmunizada con MOG. El animal comienza con una pérdida del tono muscular parcial o total de la cola (0,5-1), seguido de una paraparesia de extremidades posteriores (2-3), tetraparesia moderada (3-3,5) hasta desarrollar a una tetraparesia severa (4).

2.6.3.- Histopatología de la EAE

Los cambios histopatológicos del modelo varían en función de la especie y la cepa utilizada, sin embargo, independientemente del animal empleado para inducir la EAE, la desmielinización del SNC se asocia a un efecto mediado por linfocitos encefalitogénicos. A diferencia de lo que ocurre en la EM, la mayor alteración histopatológica del modelo ocurre en la médula espinal, mientras que en el encéfalo únicamente se aprecia una inflamación dispersa. Otra gran diferencia es que en el modelo de EAE las células T predominantes en las lesiones son las T CD4⁺, a diferencia de lo que ocurre en las lesiones de EM en las que la mayoría de las células T infiltrantes son CD8⁺ (van den Hoogen et al., 2017). El periodo inicial de la EAE se caracteriza por una infiltración perivascular en la sustancia blanca del SNC, causada por la infiltración de células inmunes periféricas a través de la BHE. Durante el desarrollo de la enfermedad, la respuesta inflamatoria va asociada a una activación astrocitaria y de la microglía, desmielinización y pérdida axonal, principalmente en el pico inflamatorio de la enfermedad, existiendo una correlación entre el daño histológico y el déficit motor observado tras la aparición de los síntomas clínicos (Schmitt et al., 2012).

3.- Interleuquina 21

La interleuquina 21 (IL-21) es un miembro de la familia de citoquinas de clase I, de carácter pleiotrópico y secretada principalmente por las células Th17, Th foliculares (Tfh) y las células NKT. La IL-21 ejerce sus diversas funciones mediante la señalización a través de un receptor transmembrana heterodimérico constituido por una subunidad específica (IL-21R) y una subunidad γ_c común a todos los receptores de citoquinas de su misma familia: la IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15. El IL-21R se expresa en la superficie de una amplia variedad de células de fenotipo inmune y no inmune, lo que explica que la IL-21 esté involucrada en la regulación funcional de un amplio rango de tipos celulares. La IL-21 al unirse a la subunidad específica del receptor, ejerce su actividad a través de la señalización por las vías JAK-STAT y de las MAP quinasas (MAPK-PI3K/AKT). La activación de JAK conlleva la activación por fosforilación de diversas proteínas STAT siendo la

fosforilación de STAT3 la que se produce de manera mayoritaria en células T (Long et al., 2019).

3.1.- Inmunobiología de la IL-21

La IL-21 regula la actividad tanto de células del sistema inmune innato (macrófagos, NK y DCs) como del sistema inmune adaptativo (células T y B). Como se aprecia en la figura 9, la IL-21 también es capaz de ejercer funciones supresoras de la inmunidad e inductoras de tolerancia, como la inhibición de la maduración de las DCs y la estimulación de células Bregs. Sin embargo, es su amplia actividad pro-inflamatoria, especialmente en poblaciones celulares implicadas en la inmunopatología de las enfermedades autoinmunes, lo que hace que la IL-21 sea un punto clave en las complejas redes regulatorias del sistema inmune y, por tanto, una interesante diana terapéutica (Spolski and Leonard, 2014).

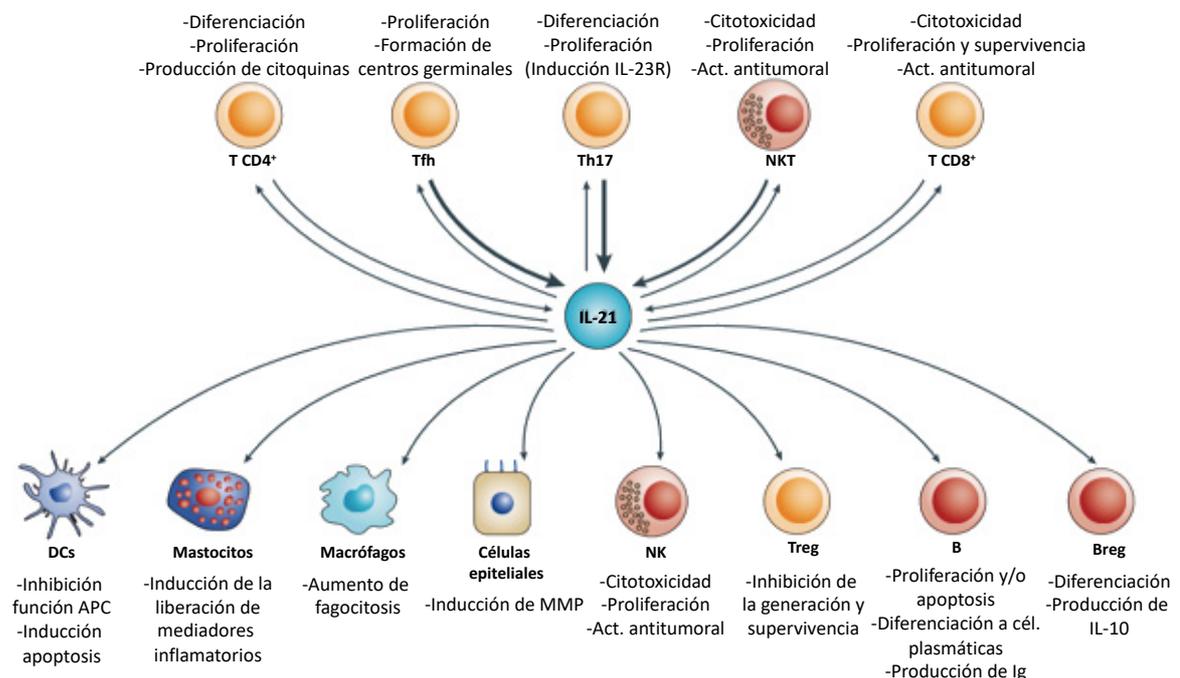


Figura 9.-Principales células productoras de IL-21 y células diana. La IL-21 es producida principalmente por las células Th17 y Tfh, y en menor medida por las células NKT, aunque también puede ser secretada por las células T CD4⁺ y T CD8⁺. La IL-21 puede actuar sobre diversas poblaciones linfoides y mieloides, al igual que en células epiteliales. Figura adaptada de (Spolski and Leonard, 2014).

3.1.1.- IL-21 y células T

Las células Th17, especialmente aquellas con un fenotipo patogénico, son uno de los principales tipos celulares productores de IL-21, llegando incluso a mostrar un incremento de expresión, tanto de mRNA como de proteína, de hasta cinco veces comparado con los niveles en que lo hacen las células Th1 y Th2 (Korn et al., 2007; Nurieva et al., 2007). En ratón, la presencia de IL-6 y TGF β es suficiente para iniciar la diferenciación de las células Th17, sin embargo, la producción de IL-21 por este tipo celular hace que se produzca una estabilización y expansión debido a un aumento de la expresión del IL-23R. Además, la IL-21 también induce la expresión del factor de transcripción ROR γ t y de la IL-17, generando una respuesta autocrina que permite la expansión de estas células pro-inflamatorias (Ivanov et al., 2007; Wei et al., 2007). Diversos estudios han reportado que ratones KO de IL-21 e IL-21R presentaron una reducción en el número de células Th17 y una menor respuesta inflamatoria mediada por esta vía (Korn et al., 2007; Nurieva et al., 2007). La IL-21 también aumenta la resistencia de las células T CD4⁺ efectoras a la supresión por las células Tregs (Clough et al., 2008; Attridge et al., 2012). En animales KO de IL-21 se ha observado que presentan un mayor número de células Tregs, debido a que en ausencia de IL-21, el TGF β favorece la generación de este tipo celular en detrimento de células Th17. Sin embargo, la capacidad inhibitoria de la IL-21 *in vivo* se cree que se produce de manera indirecta, mediante la inhibición de la IL-2, lo que disminuye la viabilidad de las células Tregs sin comprometer la viabilidad de las células T efectoras debido a que la IL-21 es capaz de suplir el papel de la IL-2 como factor de crecimiento (Attridge et al., 2012).

En el caso de las células T CD8⁺ la IL-21 no es crítica para su diferenciación pero sí que promueve su proliferación y función citotóxica, observándose que en presencia de IL-7 o IL-15 se produce un efecto sinérgico que incrementa la proliferación y la secreción de IFN γ en este tipo celular (Zeng et al., 2005). Finalmente, la IL-21 también puede actuar sobre las células Tfh. Estas células residen en los folículos de células B, siendo importantes para el desarrollo de los centros germinales implicados en la respuesta humoral. Las células Tfh secretan niveles altos de IL-21 y aunque los centros germinales

se pueden desarrollar en ausencia de IL-21, su número se reduce considerablemente (Zotos et al., 2010).

3.1.2.- IL-21 y células B

La IL-21 es una citoquina clave en la compleja regulación de la respuesta humoral de las células B dado que ejerce tanto efectos positivos como negativos sobre la proliferación, diferenciación, maduración y apoptosis dependiendo de las señales coestimuladoras existentes y el estadio de diferenciación de las células B. El IL-21R se expresa en las células B *naïve* y las células B de centros germinales y se encuentra altamente expresado en las células B activadas, a diferencia de las células B memoria o de las células plasmáticas que carecen de él (Good et al., 2006). Estudios con ratones KO de IL-21 e IL-21R reportaron que estos animales presentaban una menor respuesta frente a antígenos y el número de células plasmáticas y de centros germinales se vio profundamente reducido (Zotos et al., 2010). Sin embargo, la IL-21 también es capaz de inducir la apoptosis de células B mediante una vía mediada por caspasas, sirviendo como mecanismo de eliminación de las células B autorreactivas (Mehta et al., 2003).

3.2.- Implicación de la IL-21 en patologías autoinmunes

La IL-21 desempeña un papel multifactorial en las patologías autoinmunes, alergias, enfermedades inflamatorias y el cáncer. Numerosos estudios con animales la han posicionado como una valiosa diana terapéutica especialmente en enfermedades autoinmunes como la EM, RA o el SLE. Dichos efectos se están valorando actualmente en humanos (Long et al., 2019).

3.2.1.- Papel de la IL-21 en la EM

Diversos estudios genéticos han establecido una relación entre los polimorfismos detectados en el locus *IL21R* y la susceptibilidad a desarrollar EM (Nohra et al., 2010). Además, estudios histopatológicos en lesiones del SNC de pacientes en fase aguda y crónica han mostrado que tanto la IL-21 como su receptor se encuentran expresados en

las células T CD4⁺. La expresión del IL-21R también se ha detectado en las neuronas corticales de las lesiones, pero no en los macrófagos y la microglía MHC II⁺ (Tzartos et al., 2011). Estas observaciones se correlacionan con una mayor expresión del mRNA codificante de la IL-21 durante los brotes inflamatorios (Tegla et al., 2013) y la detección de un elevado número de células T CD4⁺ IL-21⁺ en el LCR de pacientes en fase progresiva de la enfermedad (Christensen et al., 2013). Además, pacientes con EMRR tratados con Alemtuzumab (anti-CD52) presentan disminuidos los niveles de IL-21 (Zhang et al., 2013). Estos resultados ponen de manifiesto la implicación de la IL-21 en la respuesta inflamatoria que se produce en la EM.

En ratones KO de IL-21 e IL-21R, a los cuales se les indujo la EAE, mostraron una patología significativamente atenuada. Además, la administración de IL-21 previa a la inducción de la EAE produjo un aumento de la severidad clínica (Korn et al., 2007; Nurieva et al., 2007). Dichos resultados se encuentran en relación con la disminución de los niveles de IL-21, además de IL-17 y osteoponina, al administrar IFN β en el modelo de EAE (Chen et al., 2009). Sin embargo, otros estudios en ratones KO de IL-21R han mostrado que los animales son más susceptibles al desarrollo de la EAE y lo hacen con una severidad clínica mayor, aunque con una recuperación más rápida que sus respectivos controles (Liu et al., 2008). Esta observación se cree que puede estar relacionada con la capacidad de la IL-21 para expandir las células Bregs productoras de IL-10, las cuales al ser estimuladas *ex vivo* con la citoquina y transferidas al modelo de EAE se observa una reducción de la sintomatología clínica (Yoshizaki et al., 2012). Estas discrepancias en los estudios con animales se cree que son debidas a los diferentes fondos genéticos y a los distintos protocolos de inmunización utilizados. Sin embargo, todo ello refleja el complejo papel de la IL-21 en la patología, debiendo elucidarse cual es la implicación de esta citoquina en las diferentes fases clínicas y su potencial terapéutico en la EM.

3.2.2.- Bloqueo de la IL-21 como tratamiento para la RA y el SLE

Diversos ensayos clínicos en humanos han demostrado el efecto beneficioso del bloqueo de la señalización de la IL-21 en patologías autoinmunes como la RA y el SLE, ya sea mediante un bloqueo directo de la citoquina o bien de su receptor (Tabla 2).

Tabla 2.- Efectos clínicos del bloqueo IL-21/IL-21R

| | Estrategia terapéutica | Resultados clínicos |
|-----|--|--|
| SLE | Bloqueo del IL-21R | Disminución de la hiperreactividad de las células B y de la producción de anticuerpos |
| | Anti-IL-21 + anti-TNF α | Disminución de las metaloproteasas en el tejido sinovial |
| RA | Bloqueo de IL-21 con IL-21R-F _c | Disminución de los niveles de TNF α , IL-6 e IL-1 β en el tejido sinovial |
| | Anti-IL-21 (NNC0114-0005) | Mejora de la actividad reumática |

IL-21R-F_c: proteína de fusión del IL-21R con fracción constante de IgG1 humana. Tabla adaptada de (Long et al., 2019).

4.- Interleuquina 37

La interleuquina 37 (IL-37) es una citoquina humana perteneciente a la familia de la IL-1 descubierta en el año 2000 mediante estudios *in silico*, sin embargo, hasta hace relativamente pocos años no se comenzó a estudiar sus propiedades anti-inflamatorias. El gen codificante de la IL-37 humana no presenta un gen homólogo murino, por lo que únicamente se ha podido generar un modelo animal transgénico que expresa la citoquina humana (IL-37tg) (Nold et al., 2010). El gen de la IL-37 codifica cinco transcritos diferentes, siendo la isoforma IL-37b de 218 aminoácidos la más completa de todas ellas, la cual contiene cinco de los seis exones codificantes, a excepción del exón 3 (Cavalli and Dinarello, 2018). Este gen localizado en el cromosoma 2, se encuentra próximo a los genes codificantes de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 α e IL-1 β , de manera que cuando un estímulo pro-inflamatorio induce la transcripción de éstas, también se produce la transcripción de la IL-37 con el objetivo de compensar la respuesta inflamatoria (Sharaf et al., 2014).

La expresión de la IL-37 es detectable en numerosos tejidos humanos, sin embargo, su expresión basal en individuos sanos es relativamente baja debido a una inestabilidad del mRNA regulada por el exón 5, únicamente incrementándose su expresión en condiciones inflamatorias (Bufler et al., 2004). En humanos se ha detectado expresión de IL-37 en tejidos como el hígado, pulmón, timo, los ganglios linfáticos o la médula ósea entre otros (Jia et al., 2018). Las principales células inmunes productoras de esta citoquina son monocitos, macrófagos, DCs, células T y células plasmáticas (Pan et al., 2020).

4.1.- Procesamiento, secreción y mecanismos de acción

Al igual que otras citoquinas de su misma familia, la IL-37 se sintetiza en forma de precursor (pre-IL37) la cual contiene un sitio de corte para la caspasa-1 en el residuo 20, crítico para la generación de una forma madura (IL-37₂₁₋₂₁₈) que puede ser traslocada al compartimento nuclear (Bulau et al., 2014). Se ha demostrado que la pre-IL37 es biológicamente activa tanto *in vitro* como *in vivo*, siendo en forma de pre-proteína la mayor parte de IL-37 detectada en el medio extracelular (Moretti et al., 2014). Sin embargo, estudios *in vitro* han demostrado que la pre-IL37 presenta un segundo sitio por el cual puede ser procesada por otras proteasas responsables de la generación de una forma madura alternativa de la proteína cuyo N-terminal comienza en el residuo 46 (IL-37₄₆₋₂₁₈). Dicho procesamiento se ha observado que puede ocurrir tanto en el citosol de las células productoras como en el medio extracelular, siendo las proteasas de los neutrófilos las candidatas más probables en el último caso (Pan et al., 2001). Además, se ha determinado que la forma IL-37₄₆₋₂₁₈ es unas 20-30 veces biológicamente más activa que la pre-IL37 (Li et al., 2015). Tanto la pre-IL37 como las formas procesadas pueden ser secretadas mediante mecanismos secretores desconocidos que no implican la vía clásica de secreción. Sin embargo, la localización citoplasmática cercana a la membrana plasmática, el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático sugiere que este fenómeno se produce mediante vesículas secretoras de la membrana plasmática, a pesar de la ausencia de una señal secretora (Bulau et al., 2014; Abulkhir et al., 2017).

La IL-37 es una citoquina de función dual, capaz de ejercer su función anti-inflamatoria mediante dos vías: extracelularmente, mediante la unión al receptor transmembrana, o bien intracelularmente al traslocarse al núcleo. Mediante la vía extracelular la IL-37 es capaz de transducir señales anti-inflamatorias al unirse a la subunidad IL-18R α , común a la citoquina pro-inflamatoria IL-18, sin embargo, la IL-37 recluta al correceptor IL-1R8, a diferencia del IL-18R β reclutado por la IL-18 (Tsutsumi et al., 2014; Nold-Petry et al., 2015). Por otro lado, la traslocación al núcleo de la IL-37 requiere del procesamiento previo por la caspasa-1 (Bulau et al., 2014). Posteriormente la IL-37₂₁₋₂₁₈ es capaz de interactuar con la quinasa Smad3, que tras su autofosforilación permite que el complejo pueda acceder al núcleo ejerciendo una regulación inhibitoria de la expresión de genes pro-inflamatorios (Grimsby et al., 2004; Cavalli and Dinarello, 2018) (Figura 10).

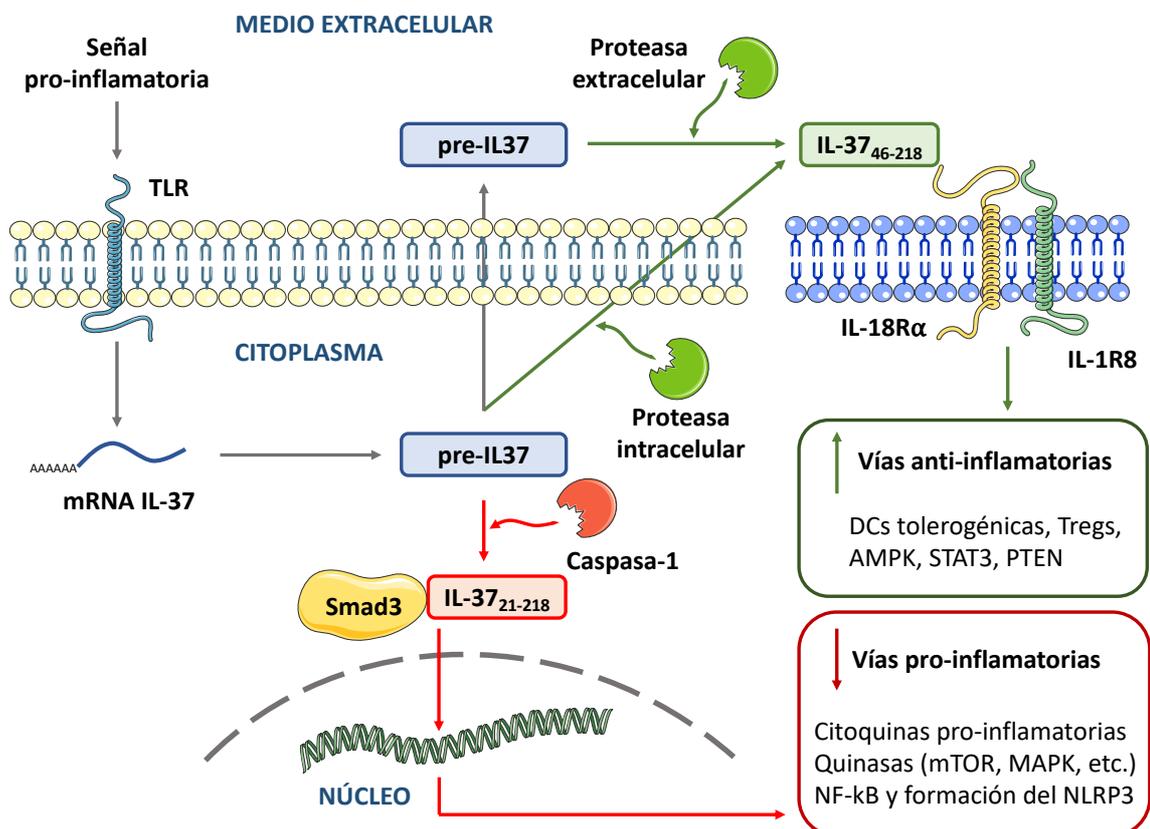


Figura 10.-Procesamiento y mecanismos de acción de la IL-37. En respuesta a señales pro-inflamatorias se produce un aumento y estabilización de la expresión de la pre-IL37. Ésta puede ser procesada por la caspasa-1, que al unirse a Smad3 puede acceder al núcleo y ejercer una regulación inhibitoria de las vías pro-inflamatorias. O bien, puede ser procesada por proteasas intracelulares o extracelulares generando una forma madura capaz de interactuar con el receptor transmembrana e inducir respuestas anti-inflamatorias. TLR: *Toll like receptor*. Figura adaptada de (Cavalli and Dinarello, 2018).

4.2.- Inmunobiología de la IL-37

4.2.1.- IL-37 en inmunidad innata

La producción de IL-37 en monocitos puede ser inducida por diversas citoquinas pro-inflamatorias como la IL-1 β , TNF α , IFN γ , IL-6 e IL-18 mientras que la IL-4 en combinación con el GM-CSF suprime su expresión. La IL-37 en monocitos inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 α , IL-1 β , IL-23, TNF α , GM-CSF e IFN γ), expresión de quimioquinas, ICAM-1 y NLRP3, mientras que incrementa la expresión de TGF β -1. La IL-37 también regula la transducción de señales mediante una modulación de fosfoquinas favoreciendo el balance hacia vías de respuestas anti-inflamatorias (Dinarello et al., 2016; Cavalli and Dinarello, 2018; Jia et al., 2018). Por otro lado, en los macrófagos reduce la activación del fenotipo pro-inflamatorio M1 mediante un aumento de la expresión del IL-1R8 en superficie lo que provoca una supresión de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (TNF α , IL-1 β , IL-12), mientras que genera una activación indirecta de macrófagos M2 mediante una activación de la respuesta Th2 y la liberación de IL-4 e IL-13, lo que favorece la activación de este fenotipo de macrófagos (Feng et al., 2019). La IL-37 es capaz también de limitar la proliferación, apoptosis y migración de los macrófagos (McCurdy et al., 2017).

Aunque tanto los monocitos como las DCs mieloides (mDCs) son los principales productores de IL-37, únicamente las mDCs son capaces de secretarla en estado basal. La IL-37 reduce la activación de las DCs mediante la reducción de la expresión en superficie de MHC II, CD40 y CD86 lo que promueve la generación de DCs tolerogénicas, regulando así la respuesta de las células T efectoras (Luo et al., 2014).

4.2.2.- IL-37 en inmunidad adaptativa

Diversas evidencias han demostrado que la IL-37 es capaz de incrementar la capacidad inmunosupresora de las células Tregs, dado que se ha detectado expresión de la citoquina en el citosol de estas células y, además, la disminución de IL-37 incrementa los niveles de IL-12, lo que favorece la polarización de las células Tregs a células Th1. La IL-37 también disminuye los niveles de IL-6 e IL-17, mientras que produce un incremento

de IL-10. Todo ello genera una inhibición de las células Th17 y un aumento de la respuesta de las células Tregs (Shuai et al., 2015; Ye et al., 2015).

4.3.- IL-37 en patologías autoinmunes

Los niveles de IL-37 pueden encontrarse tanto aumentados como disminuidos en diversas enfermedades autoinmunes. Enfermedades como la EM (Farrokhi et al., 2015), la psoriasis (Sehat et al., 2018), el SLE (Song et al., 2013) y la RA (Yuan et al., 2019) están asociadas a un aumento de los niveles de IL-37. Estos datos apoyan la evidencia de que la respuesta inflamatoria incrementa la expresión de IL-37 como mecanismo compensatorio. En contraste, la disminución de los niveles de IL-37 comparados con individuos sanos, como ocurre en el asma (Charrad et al., 2016), se interpreta como una producción inadecuada de la citoquina, lo que impide una correcta regulación de la respuesta inflamatoria. Se han realizado diversos estudios *in vitro* con células de pacientes e *in vivo* con los modelos animales de estas enfermedades con el objetivo de conocer cómo la IL-37 es capaz de controlar el proceso inflamatorio (Tabla 3).

Tabla 3.- Efecto anti-inflamatorio y mecanismos de la IL-37 en enfermedades autoinmunes

| Enfermedad | Niveles de IL-37 en humanos | Modelo animal murino | Mecanismo regulatorio |
|---------------------|------------------------------------|-----------------------------------|---|
| Enfermedad de Crohn | ↑ Mucosa colónica ↓ Suero | Colitis hIL-37tg | ↑ IL-10 ↓ IL-1 β , ↓ TNF α ↓ células T ↓ DCs |
| SLE | ↑ Suero/PBMCs | - | ↓ TNF α ↓ IL-6 ↓ IL-1 β |
| RA | ↑ Tejido sinovial /plasma/PBMCs | Artritis inducida por colágeno | ↓ IL-17 ↓ IL-1 β ↓ IL-6 ↓ Th17 |
| Psoriasis | ↑ Lesión psoriática | K14-VEGF-Tg | ↓ IFN γ ↓ CXCL8 ↓ IL-6 |

| | | | |
|------|---------------|-------------------------------|----------------------------------|
| Asma | ↓ Suero/PBMCs | Asma inducida por ovoalbúmina | ↓ IL-1β ↓ IL-6 ↓ TNFα ↓ IL-17 |
|------|---------------|-------------------------------|----------------------------------|

PBMCs: células mononucleares de sangre periférica. Tabla adaptada de (Jia et al., 2018)

5.- Terapia génica

La terapia génica se basa en la transferencia de material genético con finalidades preventivas o terapéuticas con el objetivo de que sean las propias células del paciente las encargadas de sintetizar el producto génico codificante (Anguela and High, 2019). En sus inicios, la terapia génica estaba principalmente dirigida al tratamiento de las enfermedades monogénicas mediante el reemplazo del gen defectuoso, sin embargo, hoy en día el número de ensayos clínicos destinados al tratamiento de estas enfermedades apenas supera el 11% del total, siendo el tratamiento del cáncer el que acapara el mayor número de ensayos clínicos de terapia génica con un 66% del total (Figura 11).

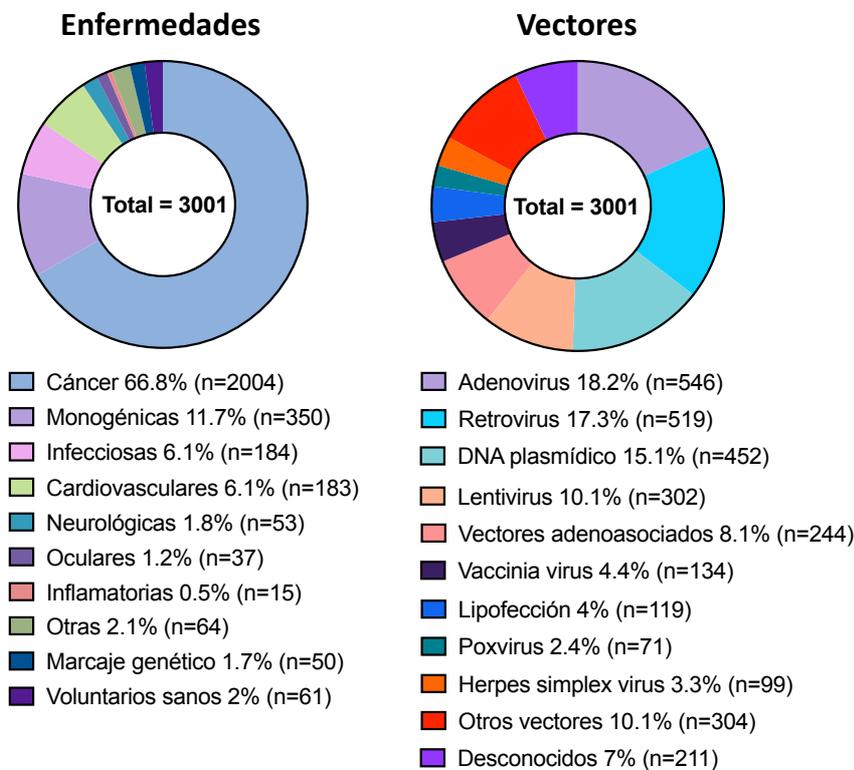


Figura 11.-Ensayos clínicos de terapia génica clasificados por tratamiento y vectores utilizados hasta 2019. Datos obtenidos de (Edelstein, 2019).

Por tanto, la terapia génica en la actualidad tiene un amplio rango de aplicaciones desde enfermedades monogénicas a infecciosas e incluso desórdenes neurodegenerativos complejos y el cáncer (Edelstein, 2019). La transferencia del material genético se realiza gracias a los denominados vectores, los cuales pueden clasificarse en virales y no virales. Entre los vectores virales destacan los adenovirus (Ad), lentivirus y virus adenoasociados (AAVs) por su amplia utilización tanto en ensayos pre-clínicos como clínicos, siendo utilizados en más del 36% de los ensayos clínicos de terapia génica (Edelstein, 2019) (Figura 11).

El vector ideal de terapia génica debe reunir una serie de características para que la estrategia resulte exitosa. En primer lugar, ha de tener la mayor especificidad celular posible por el tejido u órgano diana. Además, tiene que proteger tanto de las agresiones extracelulares como intracelulares al material genético que porta, de manera que facilite la liberación del gen terapéutico en la célula diana, el cual debe expresarse eficazmente. El vector ha de evitar ser reconocido por el sistema inmunitario y no generar una respuesta inflamatoria. Y, finalmente, tiene que ser seguro para el paciente y el entorno.

5.1.- Vectores virales para terapia génica

En la actualidad, los vectores virales son los más utilizados, por encima de los vectores no virales, debido a la gran eficacia de transferencia génica que presentan, llegando a transducir una elevada proporción de las células diana.

Estos vectores virales se obtienen mediante la sustitución de genes indispensables para la replicación viral por el gen terapéutico. De esta manera los virus recombinantes tienen capacidad infectiva, pero carecen de la capacidad replicativa, convirtiéndose así en vectores terapéuticos seguros. Sin embargo, el uso de vectores virales *in vivo* conlleva varios problemas como la inmunogenicidad, lo que debe tenerse en cuenta en la elección del vector (Tabla 4).

Tabla 4.- Vectores virales más utilizados en terapia génica

| Vector | Capacidad de empaquetamiento (material genético) | Potencial inmunogénico | Principales ventajas | Principales inconvenientes |
|---------------------|--|------------------------|--|--|
| Integrativos | | | | |
| Retrovirus | 8 kb (RNA) | Bajo | Transferencia génica persistente en células en división | Solo transduce células en división; la integración puede inducir oncogénesis |
| Lentivirus | 8 kb (RNA) | Bajo | Transferencia génica persistente en múltiples tejidos | La integración puede inducir oncogénesis |
| HSV-1 | 40-150 kb (dsDNA) | Alto | Alta capacidad de empaquetamiento y alto tropismo neuronal | Muy inmunogénicos y expresión transitoria en células no neuronales |
| Episomales | | | | |
| AAV | < 5 kb (ssDNA) | Bajo | No patogénicos y baja respuesta inmunogénica | Baja capacidad de empaquetamiento |
| Adenovirus | 8-30 kb (dsDNA) | Alto | Amplio tropismo y transducción muy eficiente | Fuerte respuesta inmunogénica inducida por la cápside viral |

HSV-1: Herpes simplex virus tipo 1, AAV: Virus adenoasociado, ssDNA: DNA de cadena simple, dsDNA: DNA de cadena doble. Tabla adaptada de (Thomas et al., 2003).

5.1.1.- Vectores adenoasociados

Los AAVs son parvovirus no patogénicos con un genoma de 4,7 kb de ssDNA en el interior de una cápside icosaédrica y sin envoltura. Estos virus requieren de una coinfección con un virus *helper* para poder replicarse. Inicialmente se creía que la replicación de los AAVs era dependiente únicamente de los Ad, sin embargo otros virus como el Herpes simplex virus (HSV) o *vaccinia* virus también pueden actuar como virus *helper* (Kotterman et al., 2015). En ausencia de un virus *helper*, el genoma del AAV puede permanecer en estado episomal o integrarse en el genoma celular, sin embargo, lo más frecuente (90% de los casos) es que permanezca en estado episomal latente en el núcleo de la célula diana (Wang et al., 2019).

El genoma del virus *wild type* (wtAAV) contiene tres marcos de lectura abiertos (ORFs) flanqueados por repeticiones terminales invertidas (ITRs), cuya función es la de servir de origen de replicación y señal de empaquetamiento. El ORF del gen *Rep* codifica para 4 proteínas (Rep78, Rep68, Rep52 y Rep48) implicadas en la replicación del genoma, regulación transcripcional, integración genómica y el ensamblaje de los viriones. El ORF del gen *Cap* codifica 3 proteínas estructurales (VP1, VP2 y VP3) que al ensamblarse dan lugar a la cápside viral. Finalmente, existe otro ORF presente como marco de lectura alternativo dentro del gen *Cap* codificante de la proteína activadora del ensamblaje (AAP), la cual permite el ensamblaje de las proteínas estructurales para la formación de la cápside viral (Kotterman et al., 2015) (Figura 12).

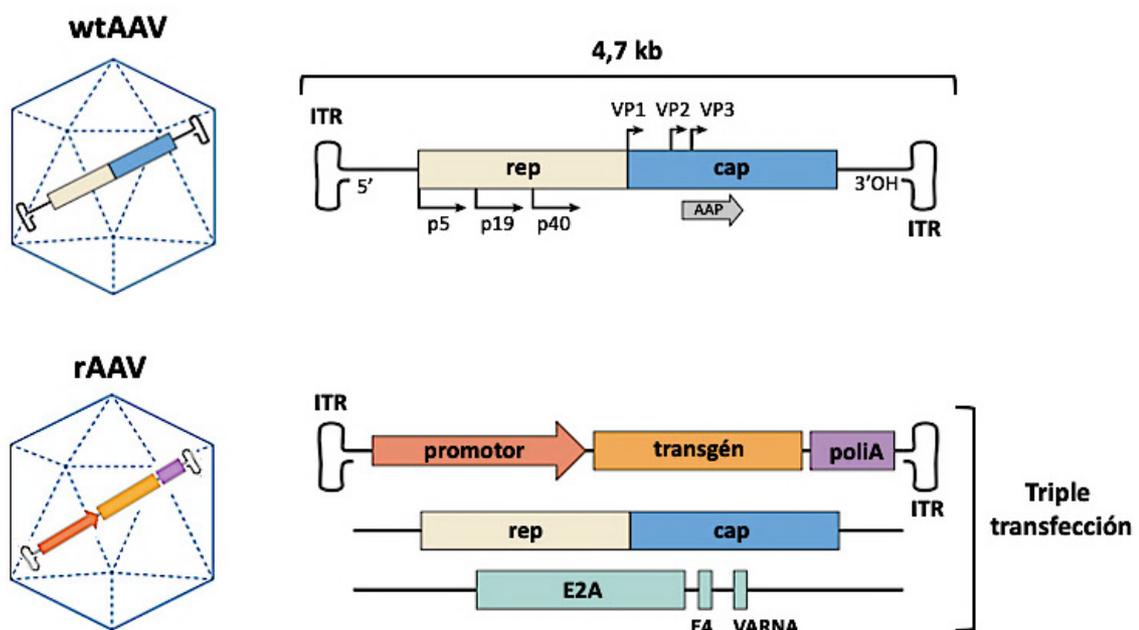


Figura 12.- Esquema y composición genética de un wtAAV y un rAAV. El genoma del wtAAV codifica los ORFs *rep*, *cap* y *aap* flanqueados por las ITRs. En el caso del genoma del rAAV, el gen de interés, precedido por un promotor de expresión y seguido por una poliA, se inserta entre las ITRs. Por otro lado, los genes *rep* y *cap* y las secuencias adenovirales E2A, E4 y VARNA son aportadas en trans en plásmidos distintos para la producción del rAAV por el sistema de triple transfección. Figura adaptada de (Kotterman et al., 2015).

Para la producción de AAVs recombinantes (rAAVs) mediante el sistema de triple transfección, el gen de interés se clona entre las ITRs sustituyendo a los genes *Rep* y *Cap*. Las ITRs son los únicos elementos necesarios en *cis* para la producción de vectores rAAVs, mientras que los genes *Rep* y *Cap* específicos del serotipo utilizado se expresan en *trans* en otro plásmido carente de ITRs. Finalmente, el virus *helper* es sustituido por

un tercer plásmido que contiene los genes adenovirales necesarios para la replicación del vector: E1a, E1b, E2a, E4orf6 y VA (Xiao et al., 1998; Allen et al., 2000). Aunque el wtAAV puede realizar una integración del genoma viral en la célula huésped, esto no ocurre en los rAAVs utilizados en terapia génica debido a que la delección del gen Rep 78/68 implica la pérdida de esta capacidad (Smith, 2008) (Figura 12).

5.1.1.1.- Tropismo y mecanismo de transducción

Los diferentes serotipos de rAAVs reconocen distintos receptores celulares, como glicoproteínas, dotándoles de un tropismo específico a nivel celular y tisular. Hasta la fecha se han detectado al menos 12 serotipos distintos y más de 100 variantes de AAVs han sido analizadas como vectores de terapia génica (Li and Samulski, 2020) (Tabla 5).

Tabla 5.- Receptores y tropismo de los diversos serotipos de AAVs

| Serotipo | Receptor primario | Co-receptor | Tropismo |
|--------------|-------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| AAV1 | Ácido siálico | AAVR | Músculo, corazón, SNC |
| AAV2 | Heparina | Integrina, FGFR, HGFR, LamR, AAVR | Hígado, músculo, SNC |
| AAV3 | Heparina | FGFR, HGFR, LamR, AAVR | Músculo, células madre |
| AAV4 | Ácido siálico | Desconocido | Ojo, SNC |
| AAV5 | Ácido siálico | PDGFR, AAVR | SNC, pulmón, ojo |
| AAV6 | Heparina, ácido siálico | EGFR, AAVR | Músculo, SNC, corazón, pulmón |
| AAV7 | Desconocido | Desconocido | Músculo, SNC |
| AAV8 | Desconocido | LamR, AAVR | Hígado, músculo, páncreas, SNC |
| AAV9 | Galactosa | LamR, AAVR | Amplio |
| AAV10 | Desconocido | Desconocido | Músculo |
| AAV11 | Desconocido | Desconocido | Desconocido |
| AAV12 | Desconocido | Desconocido | Nasal |

AAVR: receptor AAV, EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico, FGFR: receptor del factor de crecimiento de fibroblastos, HGFR: receptor del factor de crecimiento de hepatocitos; LamR: receptor de laminina-1, PDGFR: receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas. Tabla adaptada de (Li and Samulski, 2020).

El reconocimiento del rAAV por el receptor y coreceptor de superficie conlleva la internalización por endocitosis. Las partículas virales en el interior de los endosomas sufren una serie de cambios estructurales necesarios para la transducción celular originados por la variación de pH en el interior del endosoma. Tras el escape endosomal, los rAAVs ingresan al núcleo a través de los poros nucleares, donde se producirá su desencapsidación y liberación del genoma viral. El genoma ssDNA viral ha de convertirse en dsDNA para poder iniciar la expresión génica. Dicha conversión puede realizarse mediante la síntesis de la segunda cadena de DNA por las DNA polimerasas de la célula hospedadora o bien mediante un alineamiento de las cadenas anti-sentido que coexisten en el núcleo. El genoma de dsDNA sufre una circularización intra-molecular o inter-molecular por la recombinación de las ITRs. Este proceso de circularización y concatemerización estabiliza el genoma viral en forma episomal preparado para iniciar la expresión del gen terapéutico. El genoma viral también puede insertarse en el genoma de la célula, sin embargo, esto ocurre con una frecuencia muy reducida (Wang et al., 2019) (Figura 13).

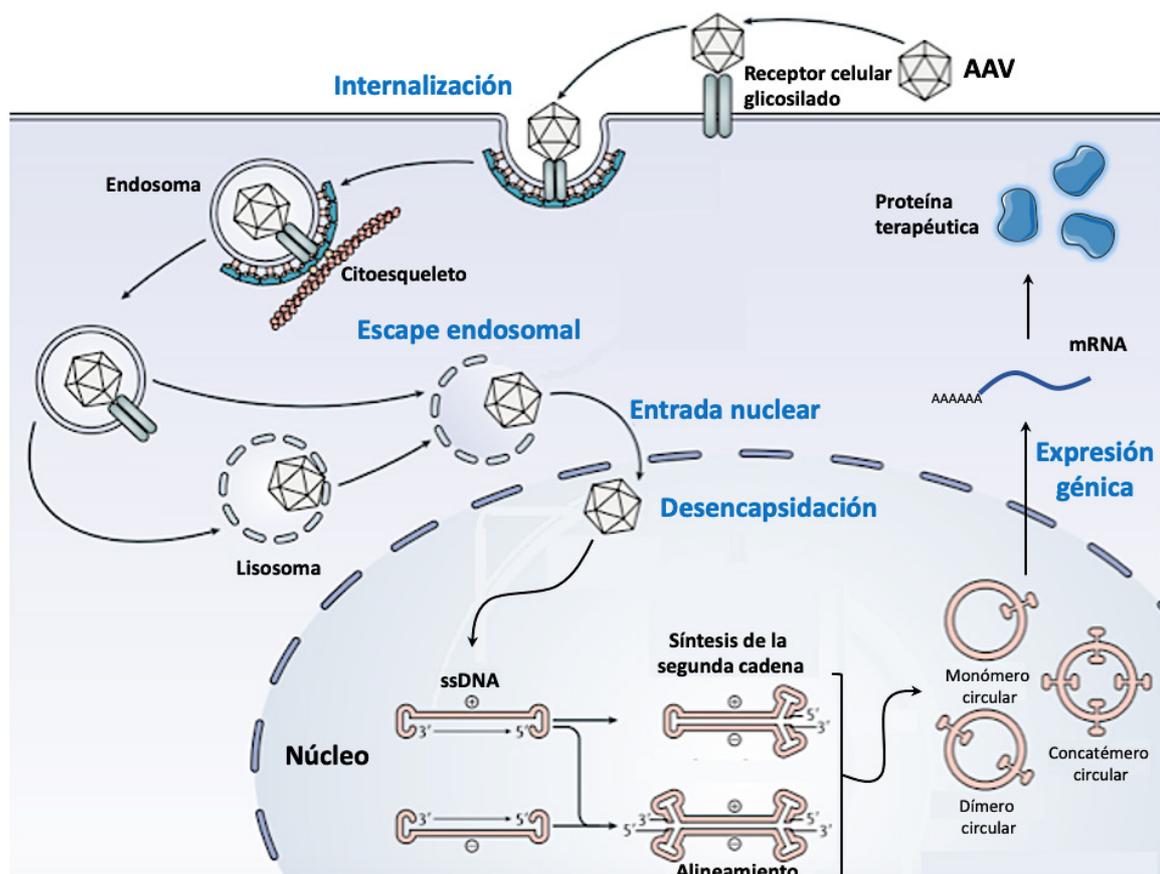


Figura 13.- Mecanismo de transducción de los rAAVs. Figura adaptada de (Wang et al., 2019).

5.1.1.2.- Ventajas y limitaciones del uso de AAVs como vectores

La utilización de AAVs como vectores de terapia génica tiene grandes ventajas. En primer lugar, presentan una baja inmunogenicidad y una ausencia de patogenicidad que los convierte en vectores con un perfil de seguridad alto. La ausencia de secuencias virales codificantes reduce la generación de una respuesta inmune contra las células transducidas permitiendo una expresión del gen de interés durante un largo periodo de tiempo, llegando a mantener una expresión estable después de varios años. Finalmente, la existencia de diversos serotipos les dota de un amplio rango de tropismo.

No obstante, el uso de rAAVs también conlleva ciertos inconvenientes, como la limitada capacidad de clonación, no pudiendo exceder los 4,7 kb teniendo en cuenta que el tamaño del promotor, poliA e ITRs ha de estar incluido. En segundo lugar, el inicio de la expresión del transgén es tardía obteniendo la máxima expresión dos semanas post-administración, debido a la necesidad de conversión del ssDNA en dsDNA para que comience la transcripción del producto génico. Esto los convierte en unos vectores relativamente lentos (Thomas et al., 2003; Wang et al., 2019).

5.1.1.3.- Respuesta inmune contra rAAVs

A pesar de que una de las grandes ventajas de vectores AAVs es la baja inmunogenicidad que presentan, se ha de tener en cuenta que la cápside proteica puede producir la activación del sistema inmune del organismo hospedador en ciertas circunstancias.

La primera barrera inmunológica, especialmente en humanos, es la existencia de NAb dirigidos contra antígenos de la cápside que son idénticos o similares a los de los wtAAVs. Diversos estudios han demostrado la presencia de NAb en la gran proporción de población humana, generados por infecciones previas con wtAAVs, capaces de neutralizar los rAAVs administrados (Louis Jeune et al., 2013). Este hecho cobra especial importancia en aquellos casos en los que se precise de una re-administración del vector, dado que la primera administración habrá generado una respuesta humoral previa (Petry et al., 2008). Esta limitación se suele superar mediante un incremento de la dosis

de vector administrada o bien farmacológicamente administrando rapamicina, lo cual induce tolerancia inmunológica (Mingozzi and High, 2013; Meliani et al., 2018). La cápside también puede desencadenar una respuesta citotóxica de células T CD8⁺, que conlleva la eliminación de las células transducidas y disminución de la expresión del transgén. Sin embargo, debido a que los rAAVs tienen un perfil inmunogénico muy bajo esta respuesta es relativamente débil, detectándose únicamente cuando se administran dosis altas de vector. Por lo que dicha respuesta no afecta a la eficacia terapéutica hasta que se supera un límite crítico por encima del cual se produce una eliminación del vector (Mingozzi et al., 2007; Mingozzi and High, 2013) (Figura 14).

El sistema inmune innato también puede activarse al poco tiempo tras la administración mediante una estimulación mediada por receptores TLR (TLR2 y TLR9), que acaba con la liberación de citoquinas pro-inflamatorias que activan la respuesta adaptativa (Rogers et al., 2011).

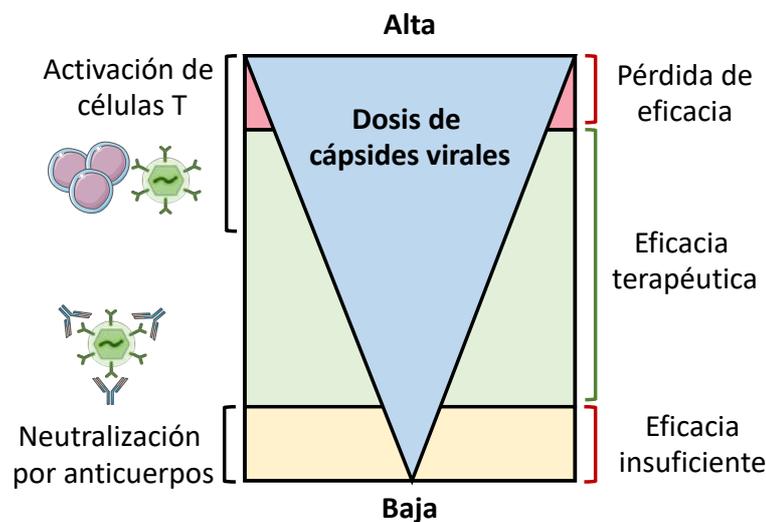


Figura 14.- Correlación entre la dosis de cápsides virales y la respuesta inmune generada tras la administración de rAAVs vía sistémica. La eficacia terapéutica de una dosis viral baja puede verse comprometida por la existencia de NABs previos dirigidos contra los antígenos proteicos de la cápside. Dicha barrera puede superarse aumentando la dosis de vector administrada. Una respuesta citotóxica contra la cápside de los rAAVs se produce al administrar dosis altas que conlleva la eliminación del vector cuando se sobrepasa cierto límite. Figura adaptada de (Mingozzi and High, 2013).

Hipótesis y objetivos

1.- Hipótesis

El bloqueo selectivo de la IL-21 y la expresión de la citoquina anti-inflamatoria humana IL-37 mediante vectores virales pueden ser tratamientos capaces de ejercer una inmunomodulación sistémica disminuyendo la respuesta pro-inflamatoria y la disfunción neurológica desarrollada en el modelo murino de EAE. La demostración de la eficacia de dichas estrategias de terapia génica puede suponer un avance en la investigación de nuevas terapias para el tratamiento de la EM.

2.- Objetivos

1. Producción de vectores virales portadores del sIL-21R y de la IL-37:
 - Clonación de los genes terapéuticos en vectores AAVs.
 - Producción, purificación y comprobación de los vectores virales.
2. Realización de una caracterización bioquímica y funcional del sIL-21R:
 - Comprobar la localización citoplasmática y secreción del sIL-21R.
 - Demostrar la interacción *in vitro* entre el sIL-21R y la IL-21.
3. Estudio del efecto de la administración sistémica de vectores AAVs en el modelo de EAE.
4. Estudio del potencial terapéutico del bloqueo de la IL-21 y de la expresión de la IL-37 en el modelo de EAE:
 - Efecto clínico de los tratamientos en abordajes preventivos y terapéuticos.
 - Estudio histopatológico y del perfil inmunológico.

Materiales y métodos

1.- Materiales

1.1.- Animales

Se utilizaron ratones hembra C57BL/6J de 6-11 semanas de edad, adquiridos a Envigo (Horst, Países Bajos). Los experimentos se realizaron en el estabulario del Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR) y se llevaron a cabo con la aprobación del Comité de Ético de Experimentación Animal de dicho instituto. A su llegada, se estabularon cinco o seis animales por jaula, en condiciones de alimentación *ad libitum* de agua y comida, con ciclos de luz-oscuridad de 12 h y con temperatura controlada.

1.2.- Vectores plasmídicos y virales

Los plásmidos utilizados fueron: pTG6600 (Transgene, Illkirch-Graffenstaden, Francia), pKP1.4 Δ CMV, pKP1.4.CMV.GFP, pXX6 (Xiao et al., 1998), pRep2Cap8, pGV, pGV Δ CMV, pGV.CMV.eGFP y pAAV.CAG. Los plásmidos generados se muestran en el Anexo.

En esta tesis se utilizaron tanto vectores Ads para los estudios *in vitro* como vectores AAVs para los experimentos *in vivo*. Los vectores generados se muestran en el Anexo.

1.3.- Líneas celulares

Las líneas celulares empleadas en la presente tesis fueron las HEK293-QB (Q-BIOgene, Carlsbad, Estados Unidos) y las HEK293-AAV (Stratagene, San Diego, Estados Unidos). Ambas líneas son clones de la línea HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293*), una línea celular inmortalizada de células embrionarias humanas de riñón que tiene incorporada la región E1 (*early 1*) del Ad en *trans* para la generación de AAVs mediante el sistema de triple transfección. La línea HEK-293QB se utilizó para la producción de vectores Ads y estudios *in vitro*. Mientras que la línea HEK293-AAV se empleó para la producción de los vectores AAVs.

2.- Métodos

2.1.- Generación de vectores plasmídicos

2.1.1.- Digestión mediante enzimas de restricción

Reactivos: Enzimas de restricción (New England Biolabs, Ipswich, Estados Unidos; Fermentas, Waltham, Estados Unidos).

Procedimiento: Las digestiones se realizaron en medio acuoso en un volumen final de 20 μ L utilizándose entre 2-10 U enzimáticas por 1 μ g de DNA plasmídico. Tanto la temperatura de digestión como el tampón necesario estaban establecidos por la casa comercial. El tiempo de digestión varió entre 2-18 h en función de las U enzimáticas, cantidad de DNA a digerir y tipo de enzima.

2.1.2.- Clonaje

La finalidad de esta técnica era conseguir la unión de dos segmentos de DNA plasmídico para la formación de una única molécula de DNA capaz de replicarse de manera autónoma en una célula bacteriana.

2.1.2.1.- Clonaje por ligación

Reactivos: Fosfatasa FastAP (*Thermosensitive Alkaline Phosphatase*, Fermentas), T4DNA ligasa (New England Biolabs).

Procedimiento: Para evitar una posible religación del vector, se desfosforilaron los extremos mediante la fosfatasa FastAP. La desfosforilación se realizó añadiendo 1 μ L de enzima e incubando 1 h a 37 °C e inactivando posteriormente a 75 °C durante 5 min. A continuación, la reacción de ligación se llevó a cabo por la T4DNA ligasa. Generalmente se utilizaron entre 10-50 ng de vector por reacción. Con el fin de calcular la cantidad molar equivalente del inserto era necesario conocer la relación de tamaño vector/inserto. Se preparó una condición equimolar (1:1), una condición en la que el inserto se encontraba en exceso (1:3), una condición control sin ligasa (para valorar la

cantidad de vector no digerido) y una condición sin inserto (para valorar si estaba ocurriendo una recircularización del vector). Las reacciones de ligación se incubaron a 16 °C *over night* (O/N). Los productos de la ligación se transformaron en bacterias *E. coli* TOP10 quimiocompetentes (apartado 2.1.3) para la posterior extracción del DNA plasmídico (apartado 2.2.1) y comprobación mediante enzimas de restricción.

2.1.2.2.- Clonaje por recombinación homóloga

Este tipo de clonaje fue utilizado para la generación de vectores plasmídicos que posteriormente se utilizaron para la producción de vectores Ads.

Reactivos: Enzimas de restricción (New England Biolabs), bacterias quimiocompetentes BJ5183 y TOP10 (generadas en nuestro laboratorio).

Procedimiento: En primer lugar, el plásmido pKP1.4ΔCMV se linealizó digiriéndolo con el enzima SwaI, mientras que el plásmido lanzadera p6600 que portaba el inserto de interés se digirió con enzimas que presentaban dianas externas a la zona de recombinación. En la reacción de recombinación se utilizaron 50 ng del vector pKP1.4ΔCMV digerido con dos cantidades de inserto, una condición equimolar (1:1) y otra con el inserto en exceso (1:3). Estas dos condiciones se transformaron en bacterias BJ5183 quimiocompetentes (apartado 2.1.3), se extrajo el DNA plasmídico de colonias aisladas (apartado 2.2.1) y se analizó el tamaño sin digerir mediante electroforesis en gel de agarosa (apartado 2.2.4), siendo aquellas colonias que presentaban un elevado peso molecular de su DNA plasmídico las que tenían mayores probabilidades de resultar positivas. Los clones seleccionados se transformaron en bacterias TOP10 que permitieron obtener mayor cantidad de DNA plasmídico para una posterior confirmación mediante enzimas de restricción.

2.1.3.- Transformación de bacterias quimiocompetentes

La transformación es el procedimiento mediante el cual las bacterias quimiocompetentes son capaces de incorporar el DNA plasmídico, lo cual se consiguió mediante un choque térmico.

Reactivos: Placas de Petri (Nunc, Waltham, Estados Unidos) de LB-agar [Miller's LB Broth (Conda, Madrid, España), agar (Panreac, Barcelona, España)] con 100 µg de ampicilina (USB, Waltham, Estados Unidos), medio LB líquido con y sin 100 µg/mL de ampicilina (USB), bacterias TOP10 o BJ5183 quimiocompetentes (generadas en nuestro laboratorio).

Procedimiento: Se descongelaron los viales de células quimiocompetentes en hielo durante 15 min y se añadieron 7 µL de una minipreparación o reacción de ligación. Se incubaron en hielo durante 25 min y posteriormente se realizó el choque térmico manteniendo los viales durante 1 min a 42 °C y poniéndolos inmediatamente en hielo durante 2 min. Se añadieron 200 µL de LB sin antibiótico y se incubaron 1 h a 37 °C en agitación para permitir que las bacterias expresasen la resistencia al antibiótico. Se sembraron las células en placas LB-agar con ampicilina y se incubó O/N a 37 °C en estufa.

2.2.- Obtención y análisis de DNA

2.2.1.- Minipreparaciones de DNA plasmídico

Se trata de una técnica utilizada para la obtención de DNA plasmídico mediante lisis alcalina de un precultivo bacteriano y posterior precipitación con isopropanol. Para ello se partió de 3 mL de medio selectivo inoculado con colonias aisladas crecidas en placa de LB-agar con antibiótico. Mediante esta técnica se obtuvo una baja cantidad de DNA plasmídico (< 15 µg) y de una baja pureza, sin embargo, era suficiente para la realización de digestiones enzimáticas.

Reactivos: Solución I de resuspensión [50 mM Tris-HCl (Sigma, San Luis, Estados Unidos) pH 8,0, 10 mM EDTA (USB)], solución II de lisis [200 mM NaOH (Panreac), 1 % SDS (USB)], solución III de precipitación proteica (4°C) [3 M KAc pH 5,5 (Panreac)], isopropanol (Panreac), etanol absoluto (Panreac), agua MilliQ con 100 µg/mL RNAsa (Sigma).

Procedimiento: Se centrifugaron los 3 mL del cultivo bacteriano durante 1 min a 12.000 g, se descartó el SN y se resuspendió el *pellet* en 200 µL de solución I. A continuación, se añadieron 400 µL de la solución II de lisis, se invirtieron los tubos varias veces y se incubaron 5 min a temperatura ambiente (RT). Se neutralizó el pH mediante la adición de 400 µL de solución III y se agitó hasta homogeneizar. Se incubaron 10 min en hielo, se centrifugaron 10 min a 12.000 g y se recuperó el SN en un tubo nuevo. Se añadieron 0,6 volúmenes de isopropanol y se incubaron 10 min a RT. Se centrifugaron 10 min a 12.000 g y se descartó el SN. Se hizo un lavado con etanol 70 % y se volvieron a centrifugar 10 min a 12.000 g. Se descartó el SN y se dejó secar el DNA precipitado. Finalmente, se resuspendió en 30 µL de agua MilliQ con RNAsa.

2.2.2.- Maxi-preparaciones de DNA plasmídico

Mediante este procedimiento se obtuvo cantidades elevadas de DNA plasmídico (250 – 1000 µg) y de alta pureza para su posterior transfección en líneas celulares. Para ello se utilizó el kit comercial E.Z.N.A Fastfilter (Omega Bio-Tek, Norcross, Estados Unidos) o el kit comercial Phoenix Maxiprep Kit (Q-BIOgene), en el caso de plásmidos para la producción de vectores Ads. En ambos casos se siguieron las instrucciones del fabricante.

Procedimiento: Se partió de 200 mL de cultivo bacteriano, tras una lisis alcalina y posterior precipitación con KAc, el DNA se purificó por cromatografía de intercambio iónico en columna y se precipitó con isopropanol. Finalmente, se resuspendió en agua MilliQ.

2.2.3.- Extracción de DNA de bajo peso molecular de muestras de tejido (Extracción de Hirt)

Este procedimiento permitió enriquecer la obtención de DNA de bajo peso molecular frente al DNA genómico.

Reactivos: Tampón de digestión Hirt [20 mM Tris-HCl pH 8,0 (Sigma), 10 mM EDTA pH 8,8 (USB), 0,6 % SDS (USB), 0,2 mg/mL proteinasa K (Promega, Madison, Estados Unidos)], NaCl 5 M (Panreac), etanol absoluto (Panreac), fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (Amresco, West Chester, Estados Unidos), agua MilliQ con 100 µg/mL RNAsa (Sigma).

Procedimiento: Se añadieron 10 µL de tampón de digestión Hirt por cada mg de tejido y se incubaron a 50 °C O/N. Al día siguiente, se agitaron las muestras para obtener una disgregación completa del tejido. Se ajustó la concentración de NaCl a 1 M y se incubó a 4 °C O/N. Se centrifugaron las muestras durante 30 min a 14.000 g a 4 °C y se traspasó el SN a un tubo nuevo. Se diluyó 1:2 el SN con agua MilliQ para disminuir la concentración de sales y se añadió 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. Tras centrifugar las muestras durante 10 min a 300 g, se obtuvo la fase acuosa superior, se traspasó a un tubo nuevo, se añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto y se centrifugaron a 12.000 g durante 10 min para que precipitase el DNA. Finalmente, se descartó el SN, se dejó secar el precipitado y se resuspendió en 30-50 µL de agua MilliQ con RNAsa.

2.2.4.- Electroforesis de DNA en gel de agarosa

El porcentaje de agarosa empleado varió entre el 1-2 % en función de los fragmentos a analizar.

Reactivos: Agarosa (Amresco), tampón de electroforesis TAE 1x [40 mM Tris-Ac pH 8,0], tampón de carga 10x [50 % glicerol (Panreac), 100 mM EDTA pH 8,0 (USB), 1 % SDS (USB), 0,1 % Azul de Bromofenol (Sigma), 0,1 % Xilencianol (Sigma)], *GeneRuler* 1 Kb o 100 pb (Fermentas), *RedSafe Nucleic Acid Staining Solution* (20.000x) (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Corea del Sur).

Procedimiento: Para preparar el gel se disolvió la cantidad necesaria de agarosa en tampón TAE 1x y se añadió el volumen necesario de RedSafe. Tras su polimerización a RT se procedió a cargar las muestras con el tampón de carga adecuado en el gel sumergido en TAE 1x y se aplicó una corriente de 60-120 V durante el tiempo necesario. Finalmente, se procedió a la visualización en un transiluminador UV (Syngene, Cambridge, Reino Unido) y se capturaron las imágenes con el programa Genesnap (Syngene).

2.2.5.- Purificación de fragmentos de DNA

La purificación de las bandas de DNA de geles de electroforesis se llevó a cabo con el kit comercial *Wizard SV and PCR Clean-Up System* (Promega) siguiendo el protocolo de la casa comercial.

2.2.6.- Cuantificación de DNA

El DNA obtenido de los diferentes procedimientos se cuantificó mediante una lectura en NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, Estados Unidos) a una longitud de onda de 260 nm. Este sistema permitió determinar la concentración de DNA en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y la pureza de éste.

2.3.- Obtención y análisis de RNA

En todos los procedimientos se trabajó con guantes, las muestras en hielo y materiales libres de RNAsas previamente limpiados con etanol 70% y RNaseZap (Ambion, Waltham, Estados Unidos).

2.3.1.- Extracción de RNA de tejido y células en cultivo

Reactivos: Qiazol (Qiagen, Hilden, Alemania), TissueLyserLT (Qiagen), cloroformo (Panreac), isopropanol (Panreac), etanol absoluto (Panreac), agua MilliQ.

Procedimiento: Para la extracción de RNA de células en cultivo, éstas se lisaron con 1 mL de Qiazol por cada 10 cm² y se agitaron las muestras a máxima velocidad. Para la obtención del RNA de tejido se añadió 1 mL de Qiazol por cada 100 mg de tejido congelado y se homogenizó con ayuda del TissueLyserLT. A continuación, se centrifugó a 12.000 g durante 10 min a 4 °C, se transfirió el SN a un tubo nuevo, se incubó 5 min a RT y se añadieron 0,2 mL de cloroformo por cada mL de Qiazol añadido inicialmente, mezclando bien las fases con el vórtex. Se incubaron las muestras 3 min a RT y se centrifugaron a 12.000 g durante 15 min a 4 °C, se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo y se añadió isopropanol a razón de 0,5 mL por cada mL de Qiazol mezclando bien las fases. Se incubaron 10 min a RT y se centrifugaron 10 min en las mismas condiciones. Para lavar el RNA precipitado se utilizó etanol 75 % a razón de 1 mL de etanol por cada mL de Qiazol y se centrifugó durante a 7.500 g durante 5 min a 4 °C. El *pellet* de RNA se resuspendió en 20 µL de agua MilliQ, se cuantificó en el Nanodrop y se almacenó a -80 °C.

2.3.2.- Extracción de RNA de esplenocitos

Para la extracción del RNA de esplenocitos se utilizó el kit comercial RNeasy mini kit (Qiagen), el cual mediante una extracción por membranas de sílice permitió obtener un RNA de mayor calidad en muestras de pequeño tamaño. El procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.3.3.- Tratamiento con DNasa y retrotranscripción

Todas las muestras de RNA fueron sometidas a un tratamiento con DNasa I (Sigma) para evitar la amplificación de DNA genómico, especialmente, en las muestras hepáticas en las que se valoró la expresión de los transgenes dado que el DNA complementario (cDNA) presentaba la misma secuencia que el genoma viral. La retrotranscripción para obtener el cDNA se realizó con el kit comercial *iScript cDNA Synthesis Kit* (BioRad, Hercules, Estados Unidos). En ambos casos se siguió el protocolo del fabricante.

2.3.4.- PCR cuantitativa (qPCR)

La qPCR nos permitió analizar las diferencias de expresión de mRNA entre diferentes muestras. En la presente tesis se utilizaron dos tipos de sondas fluorescentes distintas en función de la finalidad del estudio de expresión.

2.3.4.1.- qPCR con SybrGreen

El SybrGreen se trata de una molécula que al intercalarse entre la doble cadena de DNA emite fluorescencia que el termociclador es capaz de detectar durante la fase de elongación de las cadenas, siendo la señal proporcional a la cantidad de cDNA inicial. Este tipo de marcaje se utilizó para los estudios de expresión de transgenes tanto *in vitro* como *in vivo*.

Reactivos: iTaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad), oligos (Anexo) (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos), termociclador CFX384 *Touch™ Real-Time PCR Detection System* (BioRad), *Hard-Shell Rhin-Wall 384-Well Skirted PCR plates* (BioRad), *Microseal Adhesive Seals* (BioRad).

Procedimiento: Todas las reacciones de qPCR se realizaron con 50 ng de cDNA inicial, 5 µL de SybrGreen, 0,3 mM de cada oligo y agua MilliQ hasta un volumen final de 10 µL. Cada muestra se analizó por triplicado utilizando la pareja de oligos específica de cada gen (Anexo). El programa utilizado en todos los casos consistió en: 2 min a 98 °C para activar la polimerasa y desnaturalización del cDNA, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 5 seg de desnaturalización y 58 °C durante 30 seg de hibridación y extensión.

2.3.4.2.- qPCR con sondas TaqMan

Las sondas TaqMan constan de dos oligos de extremos, que actúan como cebadores para la amplificación, y una sonda central que contiene un fluoróforo que se encuentra unido covalentemente al extremo 5' y un desactivador de fluorescencia (*quencher*) en el extremo 3'. La tecnología TaqMan se basa en la actividad exonucleasa de la Taq polimerasa que permite liberar el fluoróforo de la sonda central hibridada a la secuencia

diana. La principal ventaja de estas sondas es su gran especificidad de detección, por ello se utilizaron para los estudios de expresión génica de factores de transcripción y citoquinas.

Reactivos: Sondas TaqMan (Anexo) (Invitrogen), *TaqMan Gene Expression Master Mix* (Invitrogen), termociclador CFX384 (BioRad), *Hard-Shell Rhin-Wall 384-Well Skirted PCR plates* (BioRad), *Microseal Adhesive Seals* (BioRad).

Procedimiento: Todas las reacciones se realizaron con 50 ng de cDNA inicial, 0,5 µL de la sonda TaqMan, 5 µL de Master Mix y agua MilliQ hasta un volumen final de 10 µL. Cada muestra se analizó por duplicado utilizando la sonda TaqMan específica de cada gen (Anexo). El programa utilizado en todos los casos consistió en: 10 min a 95 °C para activar la polimerasa y desnaturalización del cDNA, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 seg de desnaturalización y 60 °C durante 1 min de hibridación y extensión.

2.3.4.3.- Análisis de los resultados obtenidos por qPCR

Los datos obtenidos de la qPCR pertenecían al valor de Cq para cada reacción. En primer lugar, se verificó la homogeneidad de los replicados excluyéndose aquellos valores que tuviesen una diferencia mayor de 1 unidad. Finalmente, los datos se analizaron mediante el software kPCR de uso interno en nuestro laboratorio, desarrollado por el Dr. Miguel Chillón y validado por expertos en bioestadística y comparado con otros programas comerciales disponibles.

2.4.- Obtención y análisis de proteínas

2.4.1.- Extracción de proteínas

En este trabajo se realizó la extracción de proteínas totales de cultivos celulares establecidos.

Reactivos: Tampón de lisis RIPA [50 mM Tris-HCl (Sigma) pH 7,4, 150 mM NaCl (Panreac), 1 mM EDTA (USB), 1 % NP-40 (Panreac), 0.25 % deoxicolato sódico (Sigma),

50 mM NaF (Sigma), 1 mM ortovanadato sódico (Sigma), 10 mM Na-beta glicerofosfato (Sigma), 5 mM pirofosfato de sodio, inhibidores de proteasas (Calbiochem, Burlington, Estados Unidos)], sonicador (Sonics, Newtown, Estados Unidos).

Procedimiento: El *pellet* celular se resuspendió en 100 µL de tampón RIPA y se homogenizó mediante sonicación, con la muestra en hielo, utilizando 2 pulsos de 10-20 seg. Una vez finalizada la homogenización se centrifugaron las muestras a 12.000 g durante 15 min a 4 °C para eliminar los restos celulares, se recogió el SN y se almacenó a -80 °C hasta su cuantificación.

2.4.2.- Cuantificación de proteínas

Todos los extractos proteicos se cuantificaron siguiendo el método colorimétrico *BCA Protein Assay Kit* (Pierce, Waltham, Estados Unidos), basado en la capacidad quelante del ácido bicinconínico (BCA) con los iones Cu^+ resultantes de la reducción del Cu^{+2} a Cu^+ por los enlaces peptídicos de las proteínas en solución alcalina, lo que se conoce como la reacción de Biuret. Esta reacción produce el viraje de la solución verdosa a lila, que absorbe a 562 nm y puede ser medida espectrofotométricamente.

Procedimiento: Se partió de una recta patrón que consistía en diluciones seriadas de un *stock* de albúmina sérica bovina (BSA) proporcionada por el kit, que iba desde 2 mg/mL hasta 0,625 mg/mL. Paralelamente se prepararon las diluciones de las muestras proteicas a cuantificar (generalmente una dilución 1/10). Se preparó la solución de trabajo siguiendo las indicaciones del fabricante y ésta se mezcló con 20 µL de recta patrón o de las muestras a cuantificar. Se incubó la reacción durante 30 min a 37 °C. Finalmente, se midió la absorbancia a 562 nm en un lector de placas, comenzando por la recta patrón a partir de la cual se interpolaron las medidas de absorbancia de las muestras, obteniendo así la concentración de cada una de ellas.

2.4.3.- Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)

Esta técnica se basa en la capacidad de migración de las partículas con carga tras la aplicación de un campo eléctrico. La presencia de un detergente aniónico, como es el

caso del SDS, produce que las proteínas se desnaturalicen y migren separándose en función de su peso molecular.

Reactivos: Solución acrilamida:bisacrilamida (29:1) (Amresco), tampón SDS-TrisHCl pH 8,8 [1,5 M Tris (Sigma), 0,4 % SDS (USB)], tampón SDS-TrisHCl pH 6,8 [0,5 M Tris, 0,4 % SDS], APS 10 % (Amresco), tetrametil-etilen-diamina (TEMED) (Sigma), tampón de carga 5x [20 % glicerol (Panreac), 10 % SDS, 0,32 % 2-mercaptoetanol (Sigma), 0,02 % de azul de bromofenol (Sigma)], marcador de pesos moleculares *Page-Ruler Prestained Protein Ladder* (Fermentas), cubeta *Mini Protean Tetra Cell* (BioRad), tampón de electroforesis 1x [25 mM Tris, 192 mM glicina (Serva, Heidelberg, Alemania), 1 % SDS].

Procedimiento: Se preparó el gel separador de acrilamida al 10 % y un gel concentrador a una concentración de 3,9 % de acrilamida, en el cual se cargaron las muestras. Para favorecer la polimerización se añadió TEMED y APS. Para preparar las muestras, se diluyó en agua MilliQ la cantidad de proteína que se deseaba correr, se añadió el tampón de carga y se desnaturalizaron durante 10 min a 98 °C. Se cargaron las muestras en el gel y se inició el voltaje a 100 V durante 20 min para permitir que las proteínas se concentrasen antes de entrar en el gel separador y posteriormente, durante aproximadamente 1 h 30 min, se aplicaron 130 V para separar las proteínas a analizar.

2.4.4.- Electrotransferencia

Reactivos: *Transblot Semydry Transfer Cell* (BioRad), membranas PVDF (GE Healthcare, Chicago, Estados Unidos), metanol (Panreac), tampón de transferencia 1x [25 mM Tris (Sigma), 192 mM glicina (Serva)], papel *Extra Thick Western Blotting Filter Paper* (Thermo Scientific), tampón Ponceau (5 % en agua con ácido acético) (Sigma).

Procedimiento: Las proteínas en gel de acrilamida se transfirieron a una membrana de PVDF previamente activada (10 seg en metanol, 5 min en agua destilada y 15 min en tampón de transferencia). El gel de acrilamida también se equilibró durante 15 min en tampón de transferencia, al igual que dos trozos de papel *Extra Thick Western Blotting Filter Paper*. Posteriormente se prepararon las capas necesarias para la transferencia las cuales de arriba abajo son: papel, membrana, gel y papel. Se realizó la transferencia

durante 45 min a 25 V. Finalmente, opcionalmente, se observaron las proteínas transferidas mediante una tinción con Ponceau (5 min). Tras la visualización la tinción se eliminó mediante lavados seriados con agua destilada.

2.4.5.- Inmunodetección

Reactivos: Tampón TBS pH 7,5 [50 mM Tris (Sigma), 136 mM NaCl (Panreac), 40 mM KCl (Panreac)], BSA (Sigma), Tween-20 (Sigma)], solución de bloqueo (TBS, 0,1 % Tween-20, 5 % BSA), anticuerpos primarios y secundarios (Tabla 6), solución de revelado *Westar EtaC Ultra 2.0 Western-Blot substrate* (Cyanagen, Bolonia, Italia), fotodocumentador de quimioluminiscencia (BioRad).

Tabla 6.- Anticuerpos primarios utilizados

| Anticuerpo primario | Referencia | Casa comercial | Anticuerpo secundario |
|---------------------|------------|--|-----------------------|
| IL-21R | AF596 | R&D Systems, Minneapolis, Estados Unidos | Cabra ¹ |
| IL-37 | AF1975 | R&D Systems | Cabra ¹ |
| p-Stat3 | 9145S | Cell Signaling Technology, Danvers, Estados Unidos | Conejo ² |
| Stat3 | 4904S | Cell Signaling Technology | Conejo ² |
| GFP | Ab6673 | Abcam, Cambridge, Reino Unido | Cabra ¹ |
| Gapdh | 2118S | Cell Signaling Technology | Conejo ² |
| AKT | 9272S | Cell Signaling Technology | Conejo ² |

¹ *Rabbit anti-goat Ig HRP* (P0160, Dako, Glostrup, Alemania), ² *Swine anti-rabbit Ig HRP* (P0399, Dako)

Procedimiento: La membrana transferida se bloqueó sumergiéndola durante 1 h a RT en solución de bloqueo en constante agitación, evitando así las uniones inespecíficas del anticuerpo primario. Posteriormente, se añadieron 5-10 mL de la dilución de anticuerpo primario indicada por el fabricante en solución de bloqueo y se incubó en agitación O/N a 4 °C. Al día siguiente, se realizaron tres lavados de la membrana con TBST durante 10 min y se incubó con la dilución del anticuerpo secundario en solución de bloqueo durante 1 h a RT. Posteriormente, se realizaron tres lavados con TBST de 10 min y se realizó la detección. Para ello, se realizó la mezcla de los dos reactivos del kit de

revelado, se cubrió la superficie de la membrana y se incubó durante 3 min a RT. El luminol reaccionó con la peroxidasa del anticuerpo secundario emitiendo luz que pudo ser detectada por el fotodocumentador.

2.4.6.- Densitometría de bandas

Para la cuantificación de la intensidad de las bandas obtenidas, se utilizó el programa ImageJ (*Wayne Rasband National Institutes of Health, Bethesda, Estados Unidos*), siendo la intensidad de cada banda normalizada respecto a los niveles de la proteína control de su respectivo carril.

2.4.7.- Inmunocitoquímica de distribución celular del sIL-21R

Reactivos: Metanol (Panreac), tampón fosfato salino (PBS) pH 7,4 [137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 1,7 mM KH₂PO₄ (Panreac)], solución de bloqueo (PBS, 0,1 % Tween-20, 3 % BSA, 22,5 mg/mL glicina), anti-IL21R (AF596, R&D Systems), *Alexa 488 donkey anti-goat* (A32814, Invitrogen), Hoechst (H6024, Sigma).

Procedimiento: Se partió de células HEK293-QB previamente infectadas con el Ad5.sIL21R con una multiplicidad de infección (MOI) de 5 en placa de 12 pozos. Tras 48 h post-infección se aspiró el medio de cultivo y se fijaron las células 5 min con 200 µL de metanol frío. Posteriormente se realizaron tres lavados con 200 µL de PBS y se realizó un bloqueo con 200 µL de solución de bloqueo durante 1 h a RT. Transcurrido ese tiempo se añadió el anticuerpo primario anti-IL21R diluido en solución de bloqueo y se incubó O/N a 4°C. Al día siguiente, se realizaron tres lavados con PBS, se añadió el anticuerpo secundario diluido en solución de bloqueo y se incubó 1 h a RT. Trascrido ese tiempo, se volvió a realizar tres lavados con PBS y se incubaron las células con Hoechst diluido en agua durante 5 min. Finalmente, se realizó un último lavado con PBS y se montaron los cubreobjetos sobre los portas. Las preparaciones se visualizaron con un microscopio confocal (Leica TCS-SP2, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

2.5.- Técnicas de cultivo celular

Equipamiento general: Campana de flujo laminar vertical con sistema de luz UV (Telstar, Barcelona, España), incubador de células (Forma Scientific, Waltham, Estados Unidos) de atmósfera controlada (5 % CO₂, 95 % O₂, 95 % humedad relativa y 37 °C), congelador de -80 °C (Forma Scientific), microscopio invertido (Nikon, Minato, Japón).

Material fungible: Pipetas estériles de plástico (Cultek, Madrid, España), placas de 10 y 15 cm de diámetro, placas de 6, 12, 48 y 96 pozos, tubos cónicos de 15 y 50 mL (Falcon, Corning, Estados Unidos), criotubos (Corning), *scrappers* (Biologix, Shandong, China).

2.5.1.- Línea celular HEK293

2.5.1.1.- Mantenimiento de la línea

Reactivos: Medio de crecimiento Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEM) de alto contenido en glucosa (4,5 mg/mL) (Lonza, Bruguères, Francia), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS) (Sigma) y 1 % de antibióticos penicilina/estreptomicina (P/S) (Sigma).

Procedimiento: El mantenimiento normalmente se realizó en placas de 15 cm de diámetro. En primer lugar, se resuspendieron las células en su propio medio de cultivo por acción mecánica con una pipeta y se traspararon a un Falcon. Se centrifugaron 5 min a 200 g, se descartó el SN por aspiración y se resuspendió el *pellet* celular en tantos mL de medio como dilución se deseaba realizar hasta obtener una suspensión homogénea. Se sembró la placa a la cual previamente se le habían añadido 16 mL de medio de crecimiento y se incubó a 37 °C y 5 % de CO₂ hasta su uso.

2.5.1.2.- Introducción de DNA plasmídico por transfección

Reactivos: Polietilenimina (PEI) 10 mM (PolyScience, Niles, Estados Unidos), NaCl 0,9 % (B.Braun, Melsungen, Alemania), medio de transfección (DMEM, 1 % FBS , 1 % P/S).

Procedimiento: En el momento de la transfección las células debían de encontrarse en una confluencia aproximada del 60-70 %. Normalmente, las transfecciones se realizaron en placas de 6 pozos. Para realizar este procedimiento en otro tipo de placa bastaba con adecuar proporcionalmente las cantidades. Para un pozo de placa de 6, se transfectaron 3 µg de plásmido disueltos en 200 µL de NaCl 150 mM. En un tubo aparte, se mezclaron 2,25 µL de PEI por cada µg de DNA. La dilución de DNA se añadió poco a poco sobre la de PEI y se incubó 20 min a RT con la finalidad de que se formen los complejos DNA/PEI. Posteriormente, se aspiró el medio de cada pozo, se añadió medio de transfección y el volumen de DNA/PEI correspondiente hasta un volumen final de 750 µL. A continuación, se incubaron las placas a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 3 h. Finalmente, se aspiró el medio y se añadieron 3 mL de medio de crecimiento por pozo y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂.

2.5.2.- Cultivos primarios de esplenocitos de ratón

Reactivos: Filtros 70 µm (Falcon), medio X-VIVO 15 (Lonza) suplementado (10 % FBS, 2 mM L-glutamina, 50 UI/mL penicilina, 50 µg/mL estreptomicina, 2 µM 2-mercaptoetanol), PBS con 10 % FBS, placas 60 mm (Falcon), jeringas 1 mL (BD, Nueva Jersey, Estados Unidos), agua MilliQ.

Procedimiento: Los bazos se disgregaron mecánicamente con el émbolo de una jeringa estéril sobre un filtro de 70 µm colocado sobre una placa de 60 mm a la cual se le añadieron previamente 3 mL de medio X-VIVO. El filtro se colocó sobre un Falcon de 50 mL, se realizó un lavado de la placa con 3 mL de medio X-VIVO, se hicieron pasar a través del filtro y se añadieron 14 mL de PBS + 10 % FBS. Se centrifugó 5 min a 300 g, se descartó el SN por aspiración y se resuspendió el *pellet* en 1 mL de agua estéril para eliminar los eritrocitos. Tras 5-10 seg se añadió PBS + 10 % FBS hasta 20 mL, y se avocó el contenido sobre un nuevo filtro de 70 µm colocado encima de un Falcon de 50 mL. Finalmente, se centrifugó 5 min a 300 g, se descartó el SN por aspiración y se resuspendió el *pellet* en 1 mL de medio X-VIVO. La concentración de linfocitos fue determinada utilizando un contador hematológico (Coulter Act Diff, Beckman Coulter, Brea, Estados Unidos).

2.5.3.- Estudio del bloqueo de la actividad de la IL-21 con sIL-21R *in vitro*

Reactivos: Medio de infección (DMEM, 2 % FBS, 1 % P/S), IL-21 recombinante (Immunotools, Friesoythe, Alemania), tampón de lisis RIPA.

Procedimiento: En primer lugar, se preparó un medio condicionado con sIL-21R y otro con GFP como control. Para ello, se infectaron células HEK-293 QB en medio de infección a una MOI de 10. Tras 28 h, el SN se centrifugó a 200 g para eliminar restos celulares y se congeló a -80 °C hasta su utilización. Para la realización del ensayo de bloqueo se preparó un cultivo primario de esplenocitos de ratón como se detalla en el apartado 2.5.2 y se incubaron durante 2 h a 37 °C y 5 % de CO₂. En paralelo, se añadió 10 mg/mL de IL-21 en el medio condicionado con sIL-21R o con GFP y se incubó durante 1 h a 37 °C. Tras la incubación, los medios condicionados se repartieron en sus respectivos pozos y se añadieron 6·10⁶ esplenocitos por pozo. Tras 15 min de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂ se recuperaron las células y se centrifugaron 5 min a 200 g. Finalmente, se aspiró el SN y se añadieron 150 µL de tampón de lisis RIPA.

2.5.4.- Aislamiento de hepatocitos de ratón

Reactivos: Colagenasa IV (Stemcell, Vancouver, Canadá), DNAsa I (Sigma), tampón de lisis RBC (100 mM cloruro de amonio, 10mM KHCO₃, 0,1mM EDTA), filtros 100 µm (Falcon), medio X-VIVO 15 (Lonza) suplementado (10 % FBS, 2 mM L-glutamina, 50 UI/mL penicilina, 50 µg/mL estreptomina, 2 µM 2-mercaptoetanol), PBS con 10 % FBS, PBAzida [PBS, 0,1 % azida de sodio (Sigma), 1 % BSA].

Procedimiento: Se colocó el lóbulo hepático en un pozo de placa de 6 pozos, se añadieron 4 mL de medio X-VIVO y se procedió a cortarlo en pequeños trozos con la ayuda de dos bisturís. Posteriormente, se añadieron 500 µL de colagenasa IV (5.000 U/mL) y 500 µL de DNAsa I (2 mg/mL). Tras 30 min de digestión a 37 °C y 5 % de CO₂, se filtró el contenido a través de un filtro de 100 µm sobre un Falcon de 50 mL. Se realizó un lavado del pocillo con 5 mL de PBS + 10 % FBS, se volvió a filtrar el contenido y se añadieron 25 mL de PBS + 10 % FBS. Las muestras se centrifugaron 5 min a 400 g y se eliminó el SN por aspiración. El *pellet* se resuspendió en 4 mL de tampón de lisis RBC

para eliminar los eritrocitos de la muestra y se incubó 5 min a RT. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 16 mL de PBS + 10 % FBS, el contenido se avocó sobre un filtro nuevo colocado sobre un Falcon de 50 mL. Las muestras se centrifugaron 5 min a 400 g, se eliminó el SN por aspiración y se resuspendió el *pellet* en 1 mL de medio X-VIVO. Finalmente, se procedió a realizar un recuento del número de hepatocitos en cámara de Neubauer y se calculó el volumen necesario para añadir 10^6 células/tubo de citómetro. Los tubos se centrifugaron 5 min a 400 g y el *pellet* se resuspendió en 400 μ L de PBAzida para analizar las muestras con el citómetro.

2.6.- Vectores virales

2.6.1.- Producción y purificación de vectores AAVs

2.6.1.1.- Producción de vectores AAVs por triple transfección

La producción de AAVs se llevó a cabo siguiendo el protocolo de triple transfección (Xiao et al., 1998) en el cual cada plásmido guarda una función específica: pRep2Cap8 (específico del serotipo 8) codifica para las proteínas necesarias en la replicación viral y aporta las proteínas de la cápside, pXX6 proporciona los genes adenovirales necesarios para la replicación del AAV y, por último, el plásmido pGV, pAAV.CAG o pGV.TetOn que contienen las secuencias ITRs virales y el transgén.

Reactivos: PEI (PolyScience), NaCl 0,9 % (B.Braun), medio de crecimiento (DMEM, 10 % FBS, 1 % P/S), medio de transfección (DMEM, 1 % FBS, 1 % P/S), tampón de lisis [50 mM Tris (Sigma), 20 mM NaCl (Panreac), 2 mM $MgCl_2$ (Panreac)].

Procedimiento: Se prepararon 20 placas de 15 cm de la línea HEK293-AAV a una confluencia del 70 % para el día de la transfección. Se aspiró el medio de crecimiento y se añadieron 12 mL de medio de transfección/placa. Se preparó la disolución de DNA añadiendo 25 μ g de pXX6, 12,5 μ g de Rep2Cap8 y 12,5 μ g del plásmido que contiene las ITRs por cada placa en 1 mL de NaCl 0,9 %. Por otro lado, se preparó el PEI a razón de 2,25 μ L por cada μ g de DNA en 1 mL de NaCl 0,9 % por placa. Se añadió la solución de DNA sobre la que contiene el PEI y la mezcla de transfección se incubó durante 20 min a

RT. Tras este tiempo, se añadieron 2 mL de la mezcla de transfección por cada placa. Se repartió uniformemente y se incubó a 37 °C y 5 % de CO₂. Transcurridas 6 h, se realizó un cambio de medio por medio de crecimiento fresco. Tras 48 h post-transfección, se recogieron las células con ayuda de un *scraper* y se centrifugaron 15 min a 200 g. Se separó el SN de las células para purificarlo por separado y el *pellet* celular se resuspendió en 30 mL de tampón de lisis. El SN se almacenó a -20 °C y el lisado celular a -80 °C hasta su purificación.

2.6.1.2.- Purificación de vectores AAVs por gradiente de densidad de iodixanol

El protocolo se basó en una primera fase de precipitación de las partículas virales seguido de un gradiente de iodixanol (medio inerte no iónico). Durante su producción, los vectores AAVs son liberados parcialmente al SN, por lo que es necesario realizar una purificación del SN y del lisado celular por separado.

Reactivos: Benzonasa (Merck, Darmstadt, Alemania), polietilenglicol (PEG) (Sigma), tampón de lisis [50 mM Tris (Sigma), 20 mM NaCl (Panreac), 2 mM MgCl₂ (Panreac)], PBSMK [PBS, 1 mM MgCl₂ (Panreac), 2,5 mM KCl (Panreac)], PBSMK-NaCl (PBSMK, 1 M NaCl), *phenol red* (Sigma), iodixanol (Axis-Shield PoC AS, Dundee, Escocia).

Procedimiento: En primer lugar, se realizaron tres ciclos de congelación/descongelación para lisar las células y los restos celulares fueron eliminados por centrifugación 10 min a 2.000 g. Se recuperó el SN y se añadieron 6 µL de benzonasa (50 U/mL) para degradar el DNA y se incubó 1 h a 37 °C. Posteriormente se centrifugó durante 20 min a 3.000 g y se añadió PEG 40 % a razón de 1 mL/4 mL de lisado y NaCl 5 M a razón de 36,7 µL/mL de lisado, de esta manera se favoreció la precipitación de las partículas virales dejando actuar O/N a 4 °C. El precipitado viral se centrifugó a 8.000 g durante 15 min a 4 °C y se resuspendió en 5 mL de tampón de lisis. Por otro lado, al SN de la producción se le añadió PEG 40 % y NaCl 5 M en las mismas proporciones que el lisado celular permitiendo la precipitación mediante una incubación O/N a 4 °C. Al día siguiente, se centrifugó a 3.000 g durante 30 min a 4 °C, se eliminó el SN por decantación y el *pellet* se resuspendió en 5 mL de tampón de lisis. A continuación, se añadió 1 µL de benzonasa (50 U/mL) y se incubó 1 h a 37 °C. Finalmente, se mezclaron los 5 mL del resuspendido

del SN con los 5 mL del lisado celular para realizar una purificación conjunta mediante un gradiente de iodixanol.

Para la preparación del gradiente se utilizaron las siguientes concentraciones de iodixanol: 15 % (en PBSMK-NaCl), 25 % (en PBSMK con 20 μ L de *phenol red*), 40 % (en PBSMK) y 60 % (en PBSMK con 2 μ L de *phenol red*). A continuación, se preparó el gradiente por capas añadiendo de manera muy lenta las soluciones de iodixanol al tubo de ultracentrífuga (*Optiseal Polypropylene Tube*, Beckman Coulter), de menos a más densa, atravesando las capas depositadas anteriormente y se añadió la solución viral a purificar en la parte superior. Finalmente, se ultracentrifugó a 69.000 rpm en un rotor Beckman 70Ti (Beckman Coulter) durante 1 h 30 min a 18 °C y se recogieron las fracciones virales perforando el fondo del tubo (Figura 15).

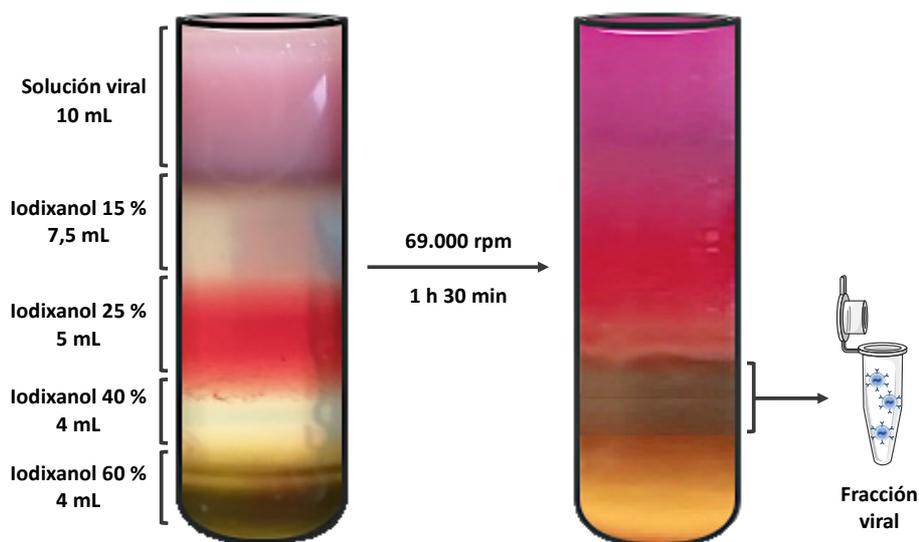


Figura 15.- Gradiente de iodixanol para la producción de vectores AAVs. La imagen de la izquierda es la apariencia del gradiente previo a la centrifugación. La imagen de la derecha muestra la apariencia del gradiente una vez centrifugado a partir del cual se recoge la fracción viral.

2.6.1.3.- Determinación del título de los vectores AAVs

La determinación del título de las producciones virales se realizó mediante la utilización de una molécula denominada *picogreen* la cual se intercala en las cadenas dsDNA permitiendo la cuantificación del número de genomas por fluorescencia. Este

procedimiento fue puesto a punto por la unidad de producción de vectores (UPV) del centro (Piedra et al., 2015).

Reactivos: Tampón de lisis (20 mM Tris pH 7,4, 200 mM NaCl, 0,2% SDS), tampón TE (10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA), *picogreen* (Invitrogen), placa de plástico negro de 96 pozos (Nunc), fluorímetro (Wallac 1420 Victor ³TM, PerkinElmer, Waltham, Estados Unidos).

Procedimiento: Se diluyeron 2 µL de cada muestra con 18 µL de tampón de lisis. La lisis de las cápsides virales se realizó en el termociclador, realizando un calentamiento durante 1 h a 70 °C seguido de un enfriamiento gradual de 5 °C cada min hasta alcanzar los 25 °C. Una vez finalizado el programa del termociclador, se traspasaron los 20 µL de cada muestra a una placa de 96 pozos negra y se añadieron 180 µL de una dilución 1/600 de *picogreen* en TE. También se cargaron muestras sin tampón de lisis que detectaron el DNA exógeno presente, el cual se restó a los valores obtenidos. Además de las muestras analizadas, se realizó una recta patrón de 0 a 40 ng de DNA, de manera que interpolando los valores de fluorescencia obtenidos de las muestras con la recta patrón se obtuvieron los ng de DNA presentes en cada muestra y se calcularon los genomas virales (gv):

$$gv = \frac{A \cdot 1,82 \cdot 10^{12}}{B}$$

A: ng/mL de DNA = ng en pozo · 1000/C

B: es la longitud del genoma del AAV (distancia entre las ITRs)

C: µL de fracción viral analizados

2.6.2.- Producción y purificación de vectores Ads

El protocolo de producción de vectores Ads se basó en una primera transfección en células HEK293-QB del plásmido linealizado para la generación de un medio condicionado con partículas virales posteriormente utilizado para la amplificación viral. Los genomas virales de este trabajo carecían del gen E1, aportado en *trans* por la línea HEK293, de manera que los vectores generados eran defectivos para la replicación.

2.6.2.1.- Preparación del genoma adenoviral para su transfección

Reactivos: Enzima PaeI (New England Biolabs), 3 M KAc (Panreac), etanol absoluto (Panreac), tampón TE (10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA).

Procedimiento: Se linealizaron 100 µg de plásmido de genoma viral con 50 U de PaeI en un volumen de 200 µL para eliminar el origen de replicación bacteriano y el gen de resistencia a ampicilina. Posteriormente, se precipitó con 1/10 volúmenes de KAc 3 M y 2,5 volúmenes de etanol frío. Se incubó 30 min a -80 °C y se centrifugó a 16.000 g durante 25 min a 4 °C descartando el SN. Se lavó el precipitado con etanol 70 % y se dejó secar a RT. Finalmente, se resuspendió en 100 µL de tampón TE y se incubó 1 h a 37 °C.

2.6.2.2.- Transfección y amplificación de los vectores adenovirales

Reactivos: PEI (PolyScience), medio de infección (DMEM, 2 % FBS, 1 % P/S).

Procedimiento: La transfección de plásmido linealizado se realizó en células HEK293-QB en placa de 6 pozos siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.5.1.2. Tras 72 h, se recogieron las células y se realizaron tres ciclos de congelación/descongelación para liberar el virus. Se centrifugó 5 min a 2.000 g para eliminar restos celulares y obtener el SN, el cual se utilizó para infectar una placa de 10 cm de células HEK293-QB al 70 % de confluencia. Pasados entre 5 y 15 días, cuando se observó el efecto citopático se recogieron las células y se lisaron mediante tres ciclos de congelación/descongelación. El lisado se centrifugó 5 min a 2.000 g y se obtuvo el SN en alto contenido de partículas virales. De nuevo, este SN se utilizó para infectar 20 placas de 15 cm de células HEK293-QB al 70 % de confluencia y tras 36 h se recogieron las células, se centrifugaron 5 min a 200 g y se resuspendieron en 10 mL de medio de la producción. Se lisaron las células mediante tres ciclos de congelación/descongelación y se centrifugaron 5 min a 2.000 g para obtener el SN a purificar.

2.6.2.3.- Purificación por gradientes de CsCl

Reactivos: CsCl (Sigma), PBS pH 7,4 [137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 1,7 mM KH₂PO₄ (Panreac)], glicerol (Sigma).

Procedimiento: Para la preparación del primer gradiente se colocaron 10 mL de CsCl 1,25 mg/mL en tubo de ultracentrifugación (*Centrifuge tubes polyallomer*, Beckman Coulter). A continuación, se añadieron 10 mL de CsCl 1,4 mg/mL en el fondo del tubo atravesando la primera solución. Por último, se añadió en la parte superior el lisado crudo a purificar. Se centrifugó con el rotor Beckman SW32 a 32.000 rpm durante 1 h 42 min a 18 °C. La banda correspondiente al virus se extrajo con una aguja hipodérmica por perforación lateral del tubo. Para el segundo gradiente se añadieron 5 mL de CsCl 1,34 mg/mL y en la parte superior se añadió la muestra procedente del primer gradiente. Se centrifugó con el rotor Beckman SW40 a 35.000 rpm durante 18 h a 18 °C. En este segundo gradiente se separaron las partículas virales vacías con una densidad menor. De nuevo, con una aguja hipodérmica se extrajo la banda correspondiente a las partículas virales y se procedió a eliminar el CsCl, el cual es tóxico para las células, mediante una columna Sephadex PD-10 (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido) sustituyéndolo por PBS. Se recogieron las fracciones virales, se les añadió un 10 % de glicerol como crioprotector y se almacenaron a -80 °C hasta su titulación (Figura 16).

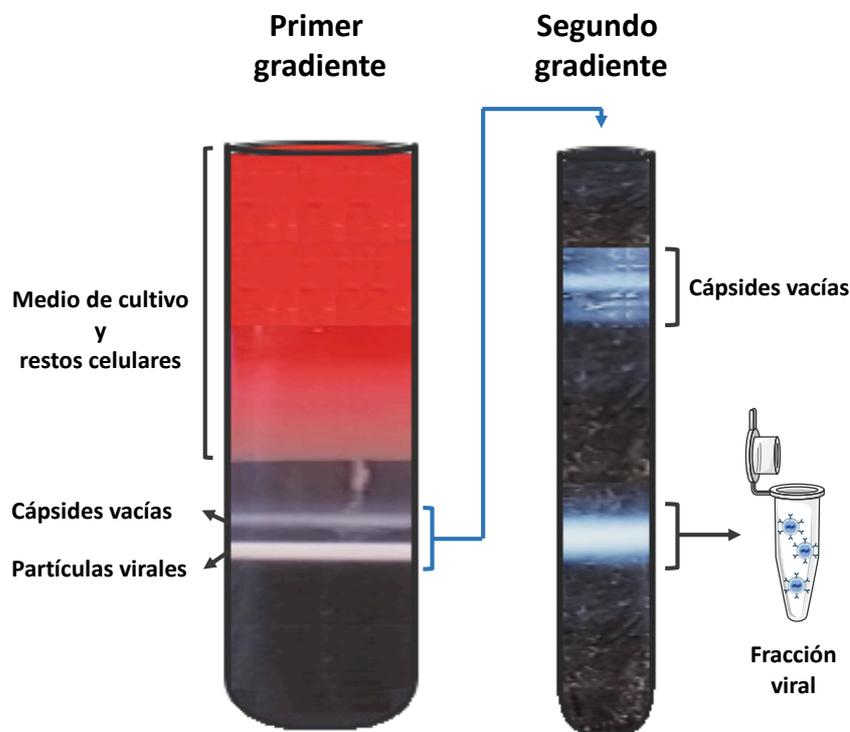


Figura 16.- Gradientes de CsCl para la purificación de vectores Ad. La imagen de la izquierda muestra el aspecto del primer gradiente del cual se separan las fracciones virales del medio de cultivo y restos celulares. La imagen de la derecha muestra el aspecto del segundo gradiente del cual se obtiene la fracción viral definitiva descartando las cápsides vacías.

2.6.2.4.- Titulación de partículas infectivas

La titulación de partículas adenovirales infectivas (IU/mL) se realizó en células HEK293-QB por dilución límite desde 10^{-3} hasta 10^{-10} en placa de 96 pozos y por triplicado. El resultado se obtuvo por tinción celular utilizando el *AdEasy Viral Titer Kit* (Stratagene) siguiendo el protocolo del fabricante.

2.6.3.- Infección de células en cultivo con vectores virales

Reactivos: Medio de infección (DMEM, 2 % FBS, 1 % P/S).

Procedimiento: Se partió de células a una confluencia aproximada del 80 % a las cuales se les sustituyó el medio de crecimiento por medio de infección y se añadió el volumen de virus correspondiente. El cálculo dependió de los genomas virales en el caso de vectores AAVs (gv/célula) o de unidades infecciosas en el caso de vectores Ad (IU/célula), lo que se conoce como MOI.

2.7.- Estudios *in vivo* con el modelo EAE

2.7.1.- Inducción de la EAE en ratones y seguimiento clínico

2.7.1.1.- Inmunización

Reactivos: Ketamina (Pfizer, Nueva York, Estados Unidos), xilacina (Bayer, Leverkusen, Alemania), NaCl 0,9 % (B.Braun), péptido MOG₄₀₋₅₅ (sintetizado por la Secció de Proteómica, Serveis Científicotècnics de la Universitat Pompeu Fabra), adyuvante incompleto de Freund (IFA) (Sigma), *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco, Nueva Jersey, Estados Unidos), toxina pertussis (Sigma).

Procedimiento: Los animales se anestesiaron con ketamina/xilacina (37/5,5 mg/kg) mediante una administración intraperitoneal (i.p). Una vez anestesiados, se pesaron y se identificaron con marcas en las orejas para permitir un seguimiento clínico individualizado. Se prepararon 100 µg del péptido MOG₄₀₋₅₅ diluidos en 100 µL de suero salino. Seguidamente, se emulsionó con el mismo volumen de IFA suplementado con

4 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA. A cada animal se le administraron 200 µL totales de emulsión repartidos en cuatro áreas próximas a los ganglios linfáticos axilares e inguinales. Además, en el momento de la inmunización y tras 48 h, se les administró vía i.v 250 ng de toxina pertussis diluida en suero salino en un volumen de 200 µL. Los animales control del proceso de inmunización sufrieron el mismo proceso en ausencia de MOG₄₀₋₅₅.

2.7.1.2.- Seguimiento clínico

A partir del día 7 post-inmunización (p.i), los animales se pesaron y evaluaron clínicamente a diario para determinar la severidad de los signos neurológicos utilizando el criterio especificado en la tabla 7 [modificado de (Espejo et al., 2001)]. Aquellos animales que alcanzaron la puntuación 6 se mantuvo dicha puntuación hasta final del experimento. La variación de peso se calculó como la variación porcentual del peso diario comparado con el peso del animal en el día de la inmunización. Todos los experimentos se realizaron en ciego de tal manera que el investigador que examinaba y evaluaba diariamente a los animales desconocía el tratamiento administrado a cada animal.

Tabla 7.- Criterio clínico de evaluación de los signos neurológicos de la EAE

| Puntuación clínica | Signos neurológicos |
|--------------------|---|
| 0 | Sin clínica |
| 0,5 | Paresia parcial de la cola |
| 1 | Parálisis total de la cola |
| 2 | Paraparesia leve de una o ambas extremidades posteriores |
| 2,5 | Paraparesia severa o paraplegia de las extremidades posteriores |
| 3 | Tetraparesia leve |
| 3,5 | Tetraparesia moderada |
| 4 | Tetraparesia (severa en extremidades posteriores) |
| 4,5 | Tetraparesia severa |
| 5 | Tetraplegia (criterio de punto final) |
| 6 | Muerte |

2.7.2.- Histopatología e inmunotinción del SNC

2.7.2.1.- Obtención y fijación del SNC

Se eutanasiaron los animales al final de experimento por asfixia con CO₂, se extrajo la médula espinal y se fijó en paraformaldehído 4 % (Casa Álvarez, Madrid, España) durante 24 h a 4 °C. Al día siguiente, se realizan tres lavados con PBS y se enviaron al Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH), donde fueron incluidas en parafina.

2.7.2.2.- Histopatología del SNC

En el Departamento de Anatomía Patológica del HUVH se realizaron cortes seriados de 4 µm de las médulas embebidas en parafina. Posteriormente, se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE) y Klüver-Barrera (KB), según procedimientos estándares, para evaluar el grado de inflamación y desmielinización, respectivamente (Tabla 8).

Tabla 8.- Criterios de evaluación de las tinciones HE y KB

Evaluación HE

0. Sin lesión.
1. Infiltración celular solo en meninges.
2. Infiltración muy discreta y superficial 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.

Evaluación KB

0. Sin desmielinización.
 1. Desmielinización leve, únicamente alrededor de los infiltrados involucrando menos del 25 % de la sustancia blanca.
 2. Desmielinización moderada que involucra menos del 50 % de la sustancia blanca.
 3. Desmielinización severa que involucra más del 50 % de la sustancia blanca.
-

2.7.2.3.- Inmunofluorescencia del SNC

Reactivos: PBS pH 7,4 [137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 1,7 mM KH₂PO₄ (Panreac)], 10x *Heat Mediated Antigen Retrieval Solution* pH 6,0 (Abcam), solución de bloqueo 1 [PBS, 0,2 % BSA (Sigma)], solución de bloqueo 2 [PBS, 0,2 % BSA, 0,05 % Tween-20 (Sigma)], anticuerpos primarios y secundarios (Tabla 9), DAPI (Sigma), medio de montaje Fluoromont (Invitrogen).

Tabla 9.- Anticuerpos primarios utilizados para el inmunomarcaje del SNC

| Marcaje | Anticuerpo primario | Referencia | Casa comercial | Anticuerpo secundario |
|----------------------|---|------------|--|----------------------------------|
| Mielina | Anti-MBP | AB980 | Chemicon, Burlington, Estados Unidos | Conejo ¹ |
| Macrófagos/microglía | Lycopersicon esculentum aglutinina (LEA) biotinilada | L0651 | Sigma | FITC-estreptavidina ² |
| Astrocitos | Anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP) conjugado con cianina-3 | C9205 | Sigma | |
| Daño axonal | Anti-neurofilamentos pesados 200 KD (SMI-32) | Sc-58554 | Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Estados Unidos | Ratón ³ |
| Células T | Anti-CD3 | A0452 | Dako | Conejo ⁴ |

¹ Alexa 488 *goat anti-rabbit* (A-11008, Invitrogen), ² FITC-estreptavidina (11-4317-87, Invitrogen)

³ Alexa 488 *goat anti-mouse* (A-11001, Invitrogen), ⁴ Alexa 568 *goat anti-rabbit* (A-11011, Invitrogen).

Procedimiento: En primer lugar, se procedió al desparafinado de las muestras en xileno y se rehidrataron mediante una batería de alcoholes de concentración descendiente hasta terminar en PBS. A continuación, se procedió a realizar el desenmascaramiento antigénico para los marcajes de SMI-32 y CD3. Tras tres lavados de 5 min con PBS, las muestras se bloquearon 1h a RT con 150 µL de solución de bloqueo 1 (marcajes de MBP, LEA y GFAP) o solución de bloqueo 2 (SMI-32 y CD3). Se realizaron tres nuevos lavados de 5 min con PBS, se añadieron 130 µL del anticuerpo primario diluido en su respectiva solución de bloqueo y se incubó O/N a 4 °C. Al día siguiente, se dejaron atemperar las

muestras 1 h a RT, se realizaron tres lavados con PBS y se incubaron 130 µL del anticuerpo secundario o estreptavidina diluido en solución de bloqueo durante 1 h a RT. Transcurrido ese tiempo, se realizaron tres lavados con PBS y se incubaron 150 µL de DAPI diluido durante 5 min. Finalmente, se realizaron lavados con PBS y se montaron las muestras con la solución de montaje. Las imágenes se tomaron con el microscopio de fluorescencia Eclipse 80i (Nikon) y fueron analizadas con el programa ImageJ. En el caso del marcaje de CD3, las células positivas fueron contadas manualmente y los resultados se expresaron en células CD3⁺/mm². Los resultados de los marcajes de LEA, MBP, GFAP y SMI-32 se expresaron como porcentaje del área positiva. En todos los casos se analizaron dos secciones coronales de médula caudal por animal y se cuantificó toda el área de sustancia blanca.

2.7.3.- Ensayos inmunológicos

2.7.3.1.- Estudio de poblaciones inmunes y citoquinas por citometría de flujo

Para el estudio de las diferentes poblaciones inmunes y de las células productoras de diversas citoquinas, se partió de esplenocitos aislados como se detalla en el apartado 2.5.2 los cuales se marcaron con diferentes anticuerpos (Anexo) para su estudio por citometría de flujo. Se utilizaron las siguientes combinaciones de anticuerpos para estudiar las diferentes poblaciones inmunes (Tabla 10):

Tabla 10.- Poblaciones celulares y productoras de citoquinas analizadas por citometría de flujo

| Panel | Población y marcadores |
|---------------|--|
| 1.- Células T | Células T: CD3 ⁺ |
| | Células T CD4 ⁺ : CD3 ⁺ CD4 ⁺ |
| | Células T CD8 ⁺ : CD3 ⁺ CD8 ⁺ |
| | Células Tregs CD4 ⁺ : CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ |
| | Células Tregs CD8 ⁺ : CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (*) |
| | Células T CD4 ⁺ activadas: CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁻ |

| | |
|--|--|
| <p>2.- Células T productoras de citoquinas pro-inflamatorias</p> | <p>Células T IL-17⁺: CD3⁺CD4⁺/CD8⁺IL-17⁺ (*) Células T IFNγ⁺: CD3⁺CD4⁺/CD8⁺IFNγ⁺</p> |
| <p>3.- Células T productoras de citoquinas anti-inflamatorias o reguladoras</p> | <p>Células T IL-4⁺: CD3⁺CD4⁺/CD8⁺IL-4⁺ (*) Células T IL-10⁺: CD3⁺CD4⁺/CD8⁺IL-10⁺ (*)</p> |
| <p>4.- Células B</p> | <p>Células B: B220⁺ Células B activadas: B220⁺MHCII⁺ Células Breg: B220⁺CD1d^{high}CD5⁺ Células plasmáticas: B220⁻CD19⁺MHCII⁻CD138⁺ (*)</p> |
| <p>5.- DCs</p> | <p>Células mieloides totales: CD11b⁺B220⁻ DCs totales: CD11b⁺B220⁻CD11c^{high} DCs totales activadas: CD11b⁺B220⁻CD11c^{high}MHCII⁺/CD80⁺ DCs mieloides: CD11b⁺B220⁻CD11c^{high}CD8a⁻ DCs mieloides activadas: CD11b⁺B220⁻CD11c^{high}CD8a⁻MHCII⁺/CD80⁺ DCs linfoides: CD11b⁺B220⁻CD11c^{high}CD8a⁺ DCs linfoides activadas: CD11b⁺B220⁻CD11c^{high}CD8a⁺ MHCII⁺/CD80⁺</p> |
| <p>6.- Macrófagos</p> | <p>Macrófagos: Ly6G⁻ F4/80⁺CD11b⁺ Macrófagos M2: Ly6G⁻ F4/80⁺CD11b⁺Ly6C⁺CD206⁺ (*)</p> |
| <p>7.- Células NK</p> | <p>Células NK: NK1.1⁺CD3⁻ Células NK activadas: NK1.1⁺CD3⁻ CD69⁺ Células NKT: NK1.1⁺CD3⁺ Células NKT activadas: NK1.1⁺CD3⁺ CD69⁺</p> |

(*) Las poblaciones de células plasmáticas, macrófagos M2, células Tregs CD8⁺, T CD8⁺IL-17⁺, T CD8⁺IL-4⁺ y T CD8⁺IL-10⁺ no pudieron analizarse debido al reducido número de eventos positivos (< 100).

Estimulación de esplenocitos

Reactivos: PMA (Sigma), ionomicina (Sigma), GolgiPlug, GolgiStop (BD Biosciences).

Procedimiento: Para el análisis de las poblaciones de células T productoras de citoquinas (paneles 2 y 3) fue necesario realizar una estimulación previa y un bloqueo del transporte extracelular. Para ello, se estimularon 2·10⁶ células con 50 ng/mL PMA, 1.000 ng/mL ionomicina y GolgiPlug/GolgiStop a 1x durante 6 h a 37°C y 5 % de CO₂.

Marcaje extracelular

Reactivos: PBAzida (PBS, 0,1 % azida de sodio, 1 % BSA), anticuerpos, marcadores de viabilidad (Anexo).

Procedimiento: El marcaje con los anticuerpos extracelulares correspondientes se realizó en placas de 96 pocillos en un volumen final de 100 μ L. En primer lugar, se añadieron $5 \cdot 10^5$ células/pocillo o bien se partió de las células estimuladas con PMA/Ionomicina. Tras un lavado con PBS se realizó el marcaje de viabilidad para descartar las células muertas. Después se bloquearon los receptores de superficie Fc con anticuerpos anti-CD16/32 para evitar uniones inespecíficas. Posteriormente, las células se incubaron 30 min a 4 °C y oscuridad con los cócteles de anticuerpos correspondientes según el panel. Por último, tras un lavado con PBAzida, las células se resuspendieron en 200 μ L de PBAzida para adquirirlas en el citómetro.

Marcaje intracelular

Reactivos: PBAzida (PBS, 0,1 % azida de sodio, 1 % BSA), *Foxp3 Fixation/Permeabilization* (eBiosciences, Santa Clara, Estados Unidos), *Fixation/Permeabilization Solution Kit* (eBiosciences).

Procedimiento: En el caso de los paneles 1, 2, 3, 6 y 7, una vez realizado el marcaje de antígenos extracelulares se debía realizar los marcajes intracelulares específicos de cada panel. En el caso del panel 1 de células T se realizó el marcaje intracelular de Foxp3 mediante el uso del kit Foxp3 Fix/Perm. En el caso de los paneles 2, 3, 6 y 7 los marcajes intracelulares se realizaron mediante el kit Fix/Perm. En ambos casos siguiendo las instrucciones del fabricante.

Adquisición y análisis de muestras

Las muestras se adquirieron utilizando el citómetro de flujo CytoFLEX (Beckman Coulter) y los datos obtenidos se analizaron con el software CytExpert 1.0 (Beckman Coulter).

2.7.3.2.- Ensayo de proliferación

Reactivos: Medio X-VIVO 15 (Lonza) suplementado (10 % FBS, 2 mM L-glutamina, 50 UI/mL penicilina, 50 µg/mL estreptomina, 2 µM 2-mercaptoetanol), péptido MOG₄₀₋₅₅, fitohemaglutinina (PHA) (Sigma), [³H]-timidina (PerkinElmer).

Procedimiento: Para evaluar la capacidad proliferativa de los esplenocitos, estos se aislaron de bazo obtenidos en la eutanasia de los animales como se detalla en el apartado 2.5.2. Se sembraron 2·10⁵ células/pocillo en una placa de 96 pozos en 200 µL de medio X-VIVO. A continuación, se estimularon las células con 5 µg/mL de MOG₄₀₋₅₅ o 5 µg/mL de PHA. También se sembraron células en ausencia de estímulo, las cuales se utilizaron como control basal. Tras 48 h de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂, se recogieron 75 µL de SN de cada pocillo y se almacenaron a -80 °C para la posterior cuantificación de citoquinas. Posteriormente, se añadió 1 µCi/pocillo de [³H]-timidina y se incubó durante 18 h a 37 °C y 5 % de CO₂. Transcurrido ese tiempo, se transfirieron las células a un filtro mediante un *harvester* (Harvester 96, TomTec, Unterschleissheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los niveles de incorporación de radioactividad se determinaron utilizando un contador de centelleo (Wallac, Turku, Finlandia). De cada ratón se analizaron cinco réplicas de cada condición y los resultados se expresaron como el índice de estimulación, el cual se calculó como el cociente entre la media de los valores de la condición estimulada con MOG₄₀₋₅₅ o PHA y la media de los valores de la condición sin estimular.

2.7.3.3.- Cuantificación de citoquinas secretadas

Reactivos: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Treg *Cytokine 17-Plex Mouse ProcartaPlex Panel* (Invitrogen), TGF beta 1 *Mouse ProcartaPlex Simplex Kit* (Invitrogen).

Procedimiento: La concentración de citoquinas secretadas se cuantificó en el SN de los esplenocitos estimulados con MOG₄₀₋₅₅ de los ensayos proliferativos (apartado 2.7.3.2). El sistema del kit permitía detectar la concentración de citoquinas tras una incubación de las muestras con unas esferas magnéticas que llevan unidos los anticuerpos específicos para cada citoquina. El procedimiento se llevó a cabo siguiendo las

instrucciones del fabricante. Para la lectura de las muestras se utilizó el Luminex Magpix (Luminex, Bolduque, Países Bajos), el *software* utilizado fue xPONENT 4.3 (Luminex) para la obtención de datos y ProcartaPlex Analyst 1.0 (eBiosciences) para el análisis de los datos.

2.7.4.- Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media de los valores obtenidos \pm el error estándar de la media (SEM). En aquellos casos en los que los datos de los grupos a comparar seguían una distribución normal se aplicaron análisis paramétricos. Cuando se realizaba la comparación entre dos grupos independientes se utilizó el análisis T-student, mientras que para la comparación de las medias de tres o más grupos se utilizó el test ANOVA con un test posthoc de Tukey. Cuando los datos no presentaban una distribución normal se aplicaron análisis no paramétricos. El análisis Mann-Whitney se utilizó para la comparación de las medias de dos grupos independientes, mientras que para la comparación de las medias de tres o más grupos se utilizó el test Kruskal-Wallis con un test posthoc de Dunn. En aquellos casos en los que se tuvieron en cuenta varios experimentos *in vivo* independientes se aplicó un modelo lineal mixto de estimación por máxima verosimilitud restringida (REML) con la solución Kenward-Roger implementada.

El análisis estadístico de los datos se realizó con los programas SPSS 26.0 (IBM, Nueva York, Estados Unidos) y GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Holdings, San Diego, Estados Unidos), el cual se utilizó también para la generación de los gráficos. En todos los casos se aplicó un análisis de hipótesis bilateral y se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas cuando el p-valor era $\leq 0,05$.

Resultados

Capítulo 1

Modulación de la respuesta inmune mediante la administración de vectores virales codificantes del receptor soluble de la IL-21

1.1.- Estrategia terapéutica y diseño del receptor soluble

Numerosos receptores solubles de citoquinas han sido hallados de forma natural en el organismo ejerciendo una regulación sobre las complejas y pleiotrópicas funciones en las cuales están involucradas sus respectivas citoquinas. Esta regulación no se da únicamente durante el desarrollo de una patología, sino que también es esencial para mantener la homeostasis natural. Estos factores solubles tienen la capacidad de unirse a sus ligandos actuando en muchas ocasiones como antagonistas naturales. Existen dos vías por las cuales se pueden generar: la liberación de la región extracelular del receptor transmembrana mediante un corte proteolítico o bien mediante un *splicing* alternativo, que conlleva la generación de una forma soluble de la proteína que carece de la región transmembrana y citosólica. Además, éste último fenómeno suele producir una alteración en el marco de lectura haciendo que se añada una secuencia terminal de aminoácidos que no se encuentra en la forma transmembrana del receptor (Jones and Rose-John, 2002; Yu and Gallagher, 2010) (Figura 17).

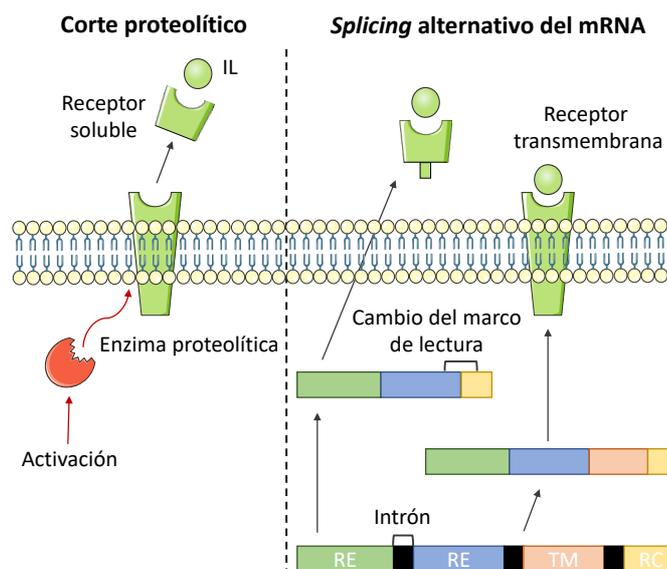


Figura 17.- Mecanismos de generación natural de receptores solubles. RE: región extracelular, TM: región transmembrana, RC: región citosólica. Figura adaptada de (Jones and Rose-John, 2002).

Nuestra estrategia terapéutica toma como base la existencia de estos receptores solubles y su utilización para el bloqueo de citoquinas clave implicadas en el proceso inflamatorio que ocurre en la EM como es el caso de la IL-21. En nuestro laboratorio se comprobó anteriormente la eficacia del tratamiento de bloqueo de la IL-23 mediante la administración de un receptor soluble específico de esta citoquina en el modelo murino de EAE (Miralles et al., 2017). Dados los resultados positivos, se consideró continuar con la misma estrategia terapéutica, pero esta vez aplicada al bloqueo selectivo de la IL-21. Como ya se ha comentado, existen receptores solubles que se encuentran de manera natural como es el caso del sIL-23R, sIL-7R o el sIL-6R, entre otros (Jones and Rose-John, 2002; Yu and Gallagher, 2010). Sin embargo, en el caso de la IL-21 no se ha identificado ninguna forma natural, ni humana ni murina, por lo que su diseño se realizó en base al receptor transmembrana simulando el proceso de corte proteolítico y utilizando así únicamente la región extracelular del receptor como molécula terapéutica (Figura 18).

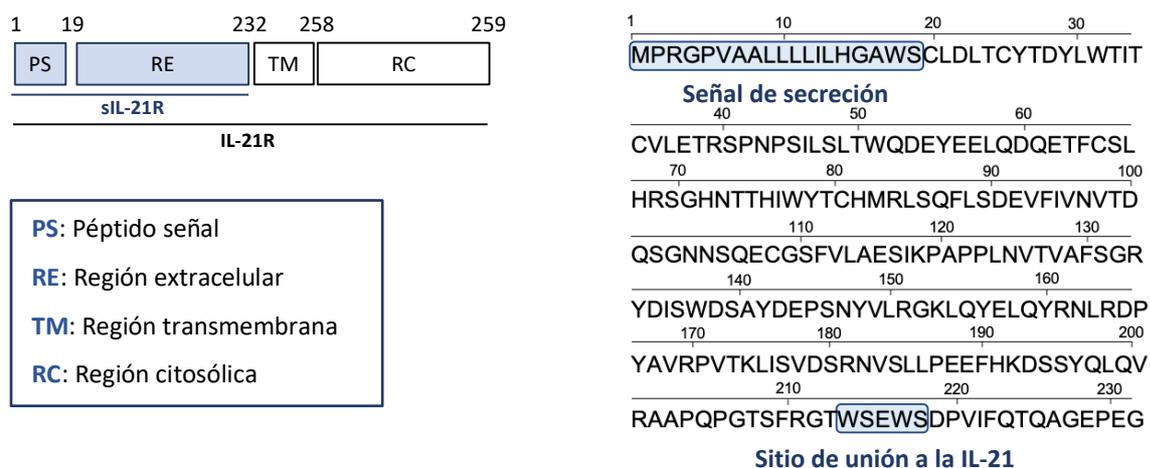


Figura 18.- Diseño y secuencia del sIL-21R. La molécula terapéutica consta de la señal de secreción y de la región extracelular, la cual contiene el sitio de unión a la IL-21 descrito.

1.1.1.- Generación de los vectores virales portadores del sIL-21R

La secuencia codificante del sIL-21R se obtuvo a partir del IL-21R murino (NM_021887.2), a la cual se le añadió en sus extremos las dianas de restricción de las enzimas NheI y NotI para permitir su posterior clonaje en el genoma de los diferentes vectores virales, tomando como punto de partida un plásmido sintético encargado a la empresa Eurofins.

Para los diferentes experimentos con animales se utilizaron vectores AAVs, debido a su baja inmunogenicidad como ya se ha comentado anteriormente. Sin embargo, estos vectores tienen una baja capacidad de infección *in vitro*. Es por esto, que para la obtención de niveles suficientes de la proteína terapéutica para realizar los estudios de funcionalidad en cultivos celulares se tuvo que generar un vector Ad, codificante del receptor soluble, que nos aportase una alta infectividad de células en cultivo (Figura 19).

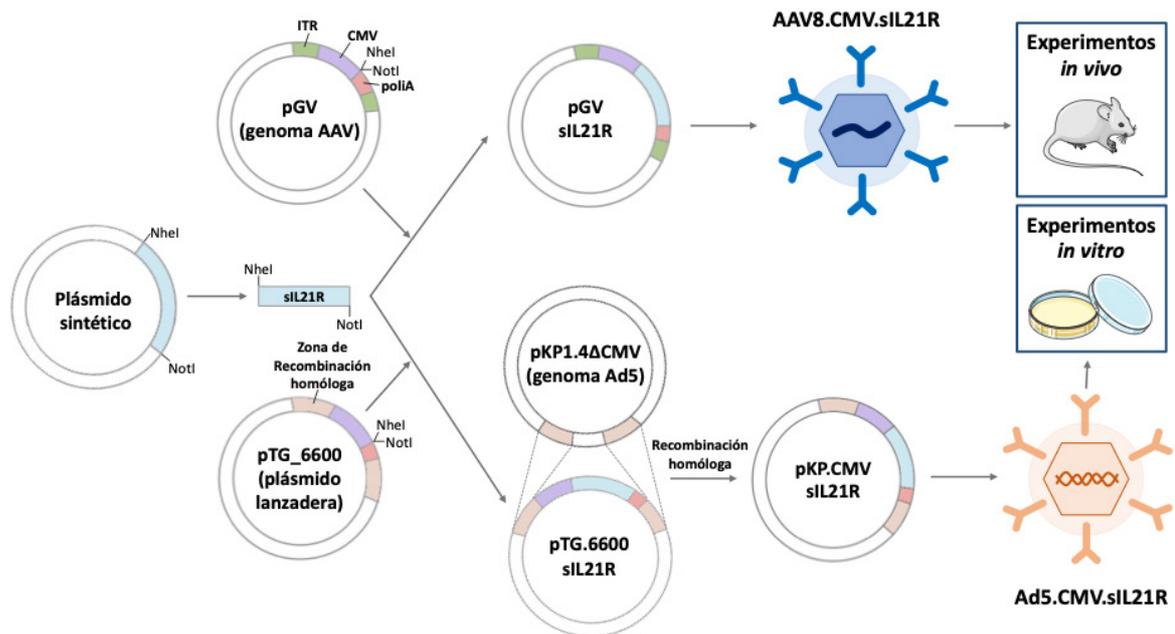


Figura 19.- Estrategia de clonaje para la generación de vectores virales portadores del sIL-21R.

1.2.- Caracterización bioquímica y funcional del receptor

Para que el receptor soluble ejerciera su función antagonista sobre la IL-21 circulante debía tener la capacidad de ser secretado por las células productoras, liberado al torrente sanguíneo y posteriormente ejercer un bloqueo selectivo de la citoquina. Al no tratarse de una molécula natural, debíamos asegurarnos de que presentaba las características deseadas.

1.2.1.- Distribución celular y secretabilidad del receptor soluble

Para confirmar la solubilidad de la molécula terapéutica, se infectaron células HEK293 con el Ad5.sIL21R a una MOI de 5. Tras 48 h post-infección las células fueron fijadas y se realizó una inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo primario anti-IL21R el cual

reconocía la región extracelular. Teniendo en cuenta que esta línea celular no expresa el receptor transmembrana, únicamente se debía detectar una señal específica perteneciente al sIL-21R. Se pudo comprobar que, efectivamente, la señal fluorescente de la molécula terapéutica se encontraba difusa por todo el citoplasma sin llegar a concentrarse en la membrana de las células infectadas (Figura 20).

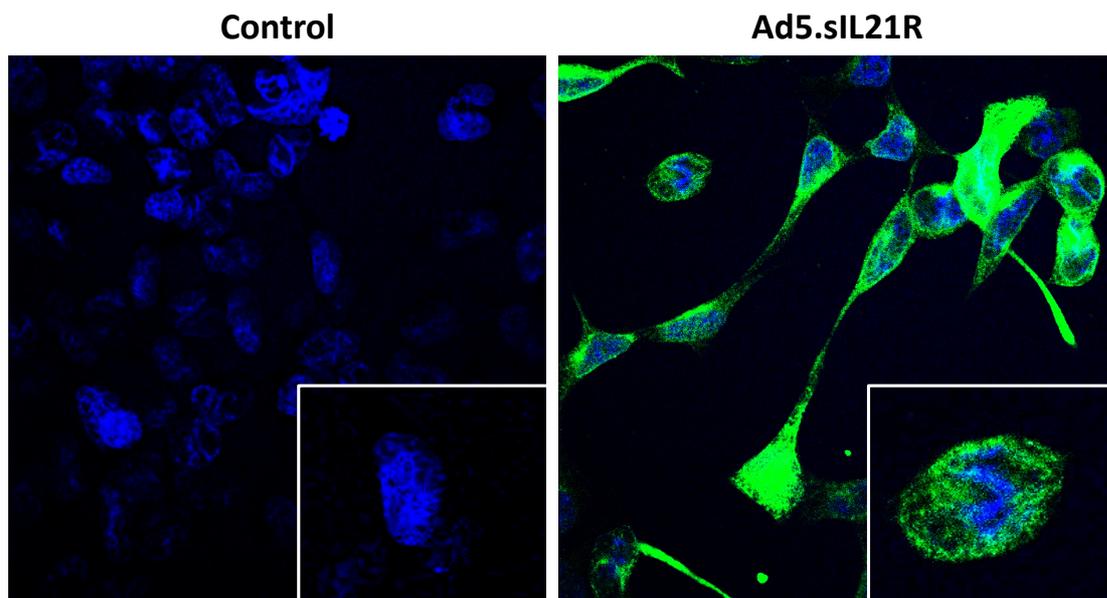


Figura 20.- Distribución del receptor soluble en células HEK293 infectadas con Ad5.sIL21R. Inmunofluorescencia con anticuerpo anti-IL21R (verde). Los núcleos celulares se encuentran marcados con Hoechst (azul). Control: células sin infectar.

En segundo lugar, se tenía que demostrar que el sIL-21R era secretado eficientemente por las células productoras. Para ello el receptor soluble tenía que ser detectado en el sobrenadante (SN) de las células infectadas. De nuevo, se infectaron células HEK293 con Ad5.sIL21R y Ad5.eGFP como vector control, a una MOI de 5, para evitar que se completara el ciclo viral y que las células infectadas se lisaran, en este caso el SN se recogió tras 24 h post-infección, se clarificó por centrifugación para eliminar restos celulares que quedasen en suspensión y finalmente, se analizó mediante *Western-Blot* la presencia del sIL-21R tanto en el lisado celular como en el SN.

Como control de la técnica se utilizó GFP pues al tratarse de una proteína intracelular debía detectarse en el lisado celular, pero no en el SN, ya que, sino estaría indicando que había presencia de proteína intracelular en el SN y, por tanto, un posible falso positivo

de la proteína terapéutica. El *Western-Blot* anti-IL21R reveló la presencia del receptor soluble tanto en el lisado celular como en el SN de las células infectadas, mientras que la proteína GFP solo se encontró en el lisado celular. Sorprendentemente, este resultado pudo observarse sin necesidad de concentrar las proteínas del SN, por lo que pudo deducirse que, además, la proteína era secretada con una gran eficiencia. En la figura 21A pueden observarse varias bandas, todas ellas específicas, pertenecientes al sIL-21R.

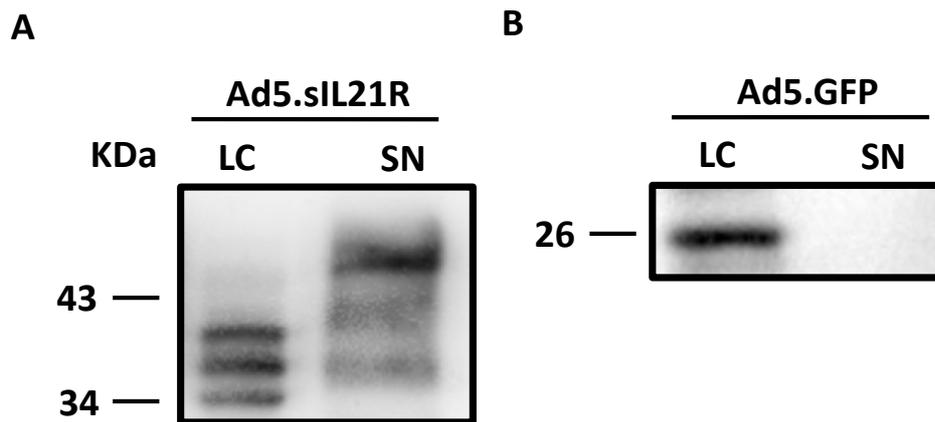


Figura 21.- Detección del sIL-21R en el SN de células infectadas con Ad5.sIL21R. Inmunodetección en el lisado celular y el SN con anticuerpo primario anti-IL21R (A) y anti-GFP (B). LC: lisado celular.

1.2.2.- Estudio de la capacidad de bloqueo del sIL-21R

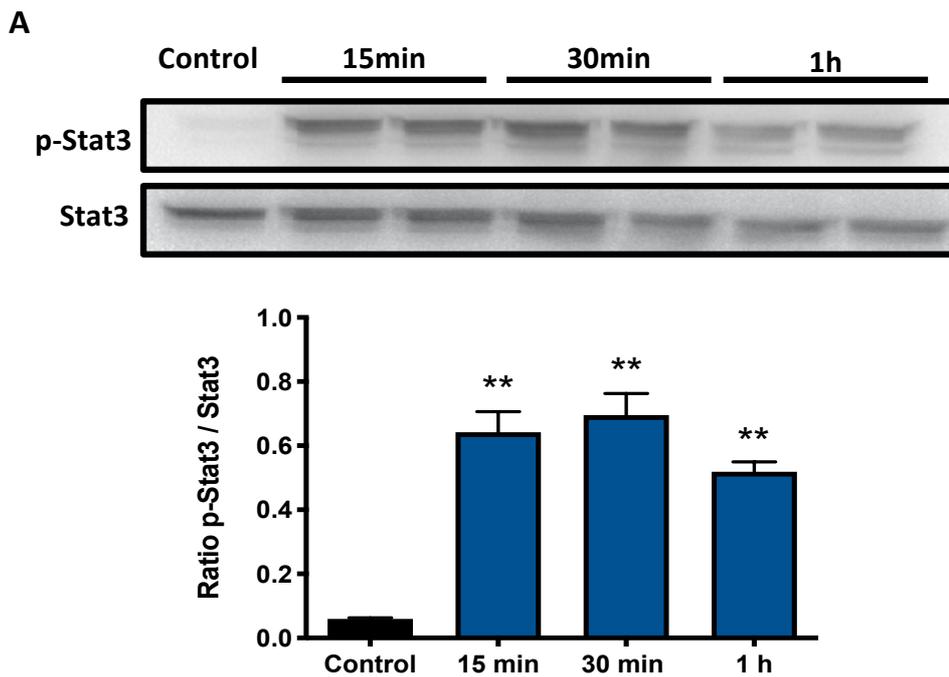
Por último, debía demostrarse que el receptor soluble diseñado era capaz de realizar un bloqueo selectivo de la IL-21 murina. La interacción sIL-21R/IL-21 no pudo demostrarse mediante técnicas de análisis directo como el *Western-Blot* no desnaturalizante, debido a que la interacción entre las dos moléculas se perdía durante el desarrollo de la técnica. Es por ello que dicha interacción se demostró de manera indirecta mediante el bloqueo de la señalización intracelular del receptor transmembrana. Como ya se ha comentado, la principal señal intracelular que se produce cuando la IL-21 interacciona con el IL-21R es la fosforilación de Stat3 (p-Stat3). Por tanto, si el sIL-21R secretado era capaz de bloquear la IL-21 añadida al medio se debía obtener una menor señal de p-Stat3.

En primer lugar, se determinó cuál era el tiempo mínimo requerido para poder detectar la estimulación de los esplenocitos por la citoquina. Para ello, se aislaron esplenocitos murinos y se incubaron con 10 mg/mL de IL-21 durante diferentes periodos de tiempo.

Resultados

Se determinó que una incubación de 15 min era suficiente para obtener una óptima estimulación con IL-21 de los esplenocitos en cultivo (Figura 22A).

Para la realización del experimento de interacción en las condiciones previamente definidas se llevó a cabo una pre-incubación durante 1 h a 37 °C de la IL-21 en un medio condicionado con alto contenido del sIL-21R obtenido mediante la infección de células HEK293 con el Ad5.sIL21R. Posteriormente, se realizó una incubación de 15 min con los esplenocitos. Al valorar la señalización de p-Stat3 se pudo observar que aquellos esplenocitos que habían sido incubados con el medio que contenía tanto el receptor soluble como la IL-21, presentaban una señalización significativamente menor que aquellos que habían sido incubados con un medio en el que únicamente había presencia de IL-21, lo que demostró que el receptor soluble secretado también era funcional (Figura 22B).



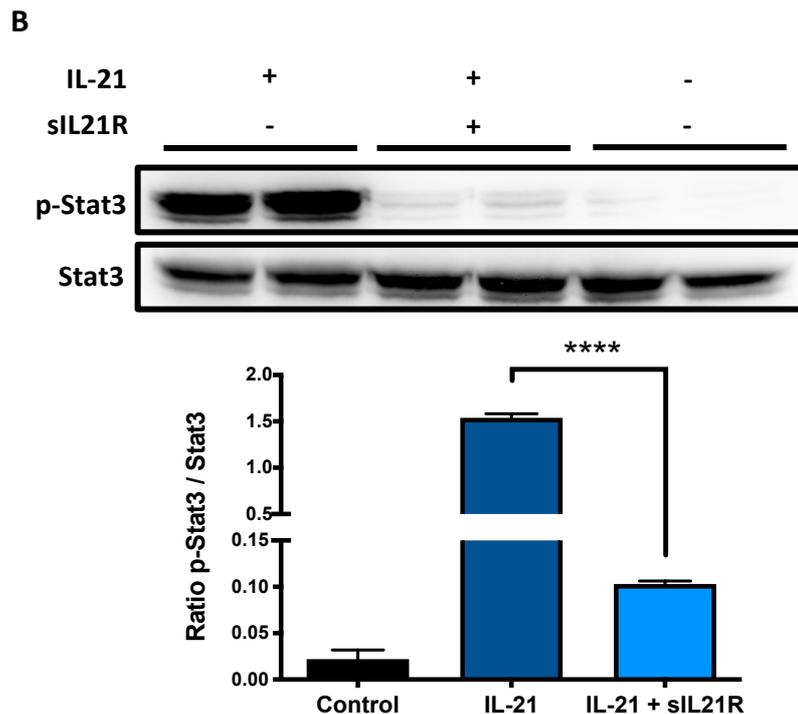


Figura 22.- Demostración de la capacidad de bloqueo del sIL-21R. Estudio de la activación de esplenocitos de ratón con IL-21 a diferentes tiempos (A). Estudio de la capacidad de bloqueo del sIL-21R tras una pre-incubación con IL-21 (B). En ambos casos se realizó una inmunodetección de la fosforilación de Stat3 con un anticuerpo primario anti-pStat3, normalizada respecto a Stat3 total. Control: lisado celular de esplenocitos sin estimular. Los resultados pertenecen a la suma de dos experimentos independientes. Los datos se representan como la media \pm SEM. ** ($p < 0,01$), **** ($p < 0,0001$).

1.3.- Tratamiento preventivo con AAV8.CMV.sIL21R en el modelo murino de EAE

1.3.1.- Diseño experimental

Una vez validadas todas las características bioquímicas y funcionales del sIL-21R se estudió su potencial terapéutico en un modelo experimental de EM, realizando, inicialmente, un abordaje preventivo. El estudio se realizó en el modelo murino de EAE, el cual desarrolla una enfermedad crónica no remitente, consistente en una parálisis ascendente (desde la cola hasta los miembros anteriores) al ser inmunizado con el péptido MOG₄₀₋₅₅.

Teniendo en cuenta que la respuesta inmune inicial en la EAE tiene su origen en periferia se decidió que lo más coherente era realizar una administración i.v. del vector terapéutico para obtener una expresión mayoritariamente hepática, ya que es el

Resultados

principal órgano secretor del organismo. Al tratarse de un abordaje preventivo, los vectores virales se administraron 21 días antes de la inmunización, ya que atendiendo a la cinética de infección de un AAV el momento de la inducción de la enfermedad coincidiría con el de la máxima expresión del transgén. Todos los experimentos incluyeron un grupo control negativo del tratamiento, al cual se le administró un vector del mismo serotipo, pero con ausencia de expresión de transgén terapéutico (grupo null). Los primeros experimentos también incluyeron un grupo control positivo de enfermedad (grupo EAE) para valorar si la administración de vectores virales tenía algún efecto sobre el curso clínico de la enfermedad.

El punto final de cada uno de los experimentos realizados en el presente trabajo fue definido en función de los estudios que se deseaban realizar. En primer lugar, para determinar cuál era el efecto del tratamiento sobre la clínica se realizó la eutanasia de los animales a día 27 p.i (fase crónica), mientras que para los estudios inmunológicos los animales se eutanasiaron a día 15 p.i (fase aguda) (Figura 23).

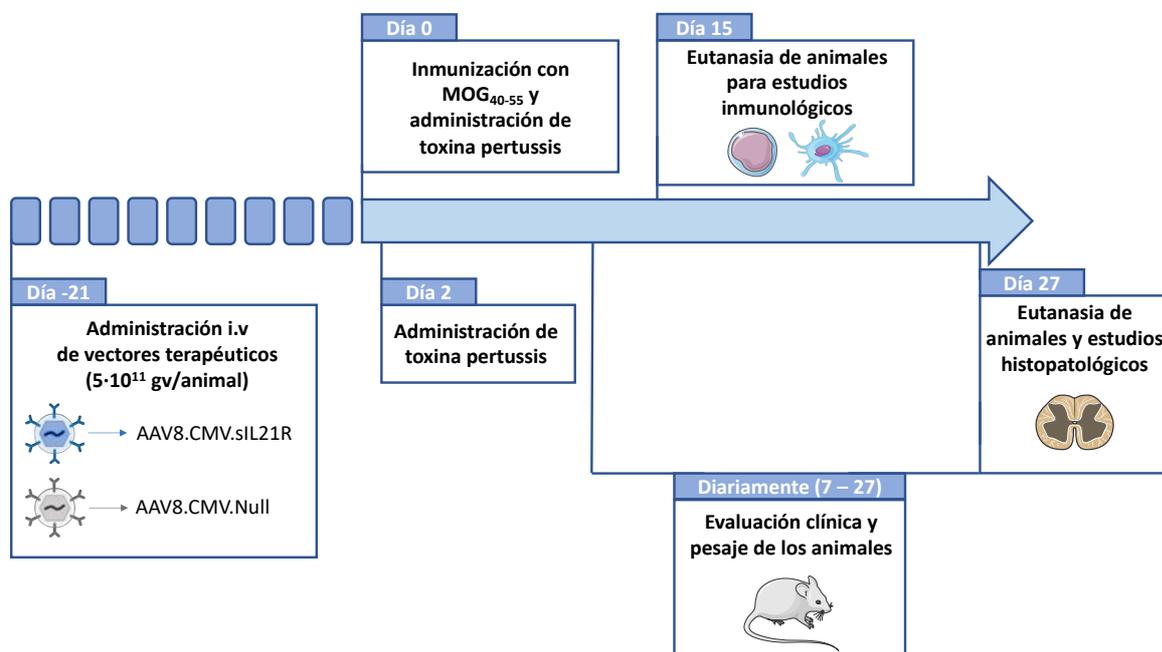


Figura 23.- Esquema del diseño experimental del abordaje preventivo en modelo de EAE con AAVs codificantes del sIL-21R.

1.3.2.- Efecto de la administración sistémica de vectores virales en el modelo de EAE

Para confirmar que la administración de vectores AAVs no tenía ningún efecto sobre el curso clínico de la EAE, a los ratones se les administró una dosis de $5 \cdot 10^{11}$ gv/animal del vector AAV8.Null (grupo null), tres semanas antes de la inmunización. En el experimento también se incluyó un grupo de ratones no tratados (grupo EAE). No se evidenciaron diferencias clínicas entre el grupo null y el grupo EAE. De igual forma, tampoco se observaron diferencias entre grupos en relación a la pérdida de peso, variable estrechamente relacionada con la aparición de los signos clínicos (Figura 24, Tabla 11), lo que indicaba que la administración de vectores AAVs no tenía un efecto sobre curso clínico de la EAE.

Tabla 11.- Parámetros clínicos de la administración preventiva de vectores AAV8.Null

| Grupo experimental | Incidencia | Puntuación clínica (AUC) | Puntuación clínica máxima | Variación de peso (AUC) |
|--------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|
| EAE | 15 / 16 (93,75 %) | $50,40 \pm 3,96$ | $3,90 \pm 0,29$ | $21,43 \pm 39,62$ |
| Null | 16 / 17 (94,18 %) | $50,59 \pm 4,17$ | $3,59 \pm 0,27$ | $25,78 \pm 37,11$ |
| p - valor | 0,965 | 0,608 | 0,119 | 0,878 |

Los datos se presentan como la media \pm SEM. AUC: área bajo la curva.

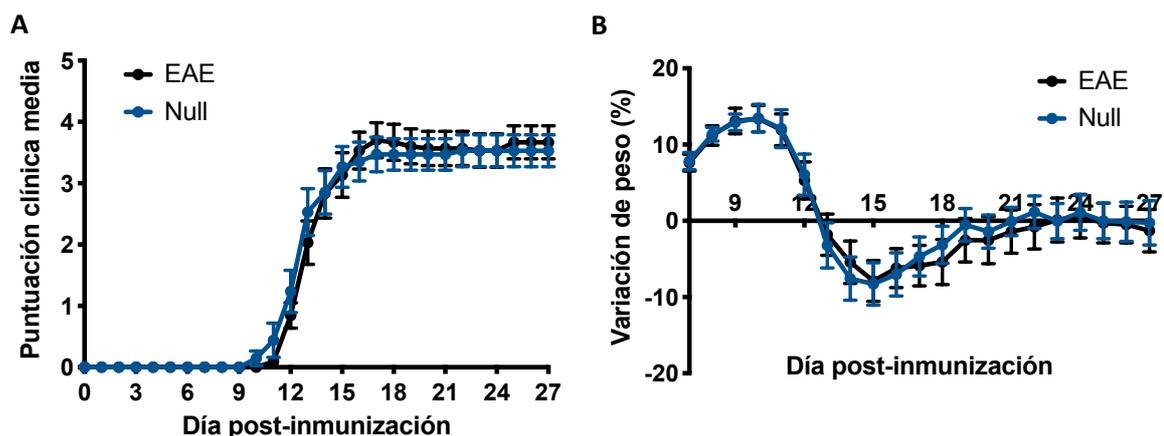


Figura 24.- Efecto clínico de la administración de AAVs en el modelo de EAE. Seguimiento de la evolución clínica (A) y variación porcentual del peso (B) del grupo null (n=17) y grupo control EAE (n=16). Los datos se representan como la media \pm SEM.

También se estudió el posible efecto de la administración de vectores AAVs a nivel inmunológico. Para ello, los esplenocitos se cultivaron en presencia del péptido

encefalitogénico (MOG₄₀₋₅₅), de un estímulo policlonal (PHA) o en ausencia de estímulo (control negativo de proliferación y referencia para la normalización de los resultados). No se observaron diferencias en la respuesta proliferativa de los animales de ambos grupos ni en fase aguda (día 15 p.i) ni en fase crónica (día 27 p.i) (Figura 25).

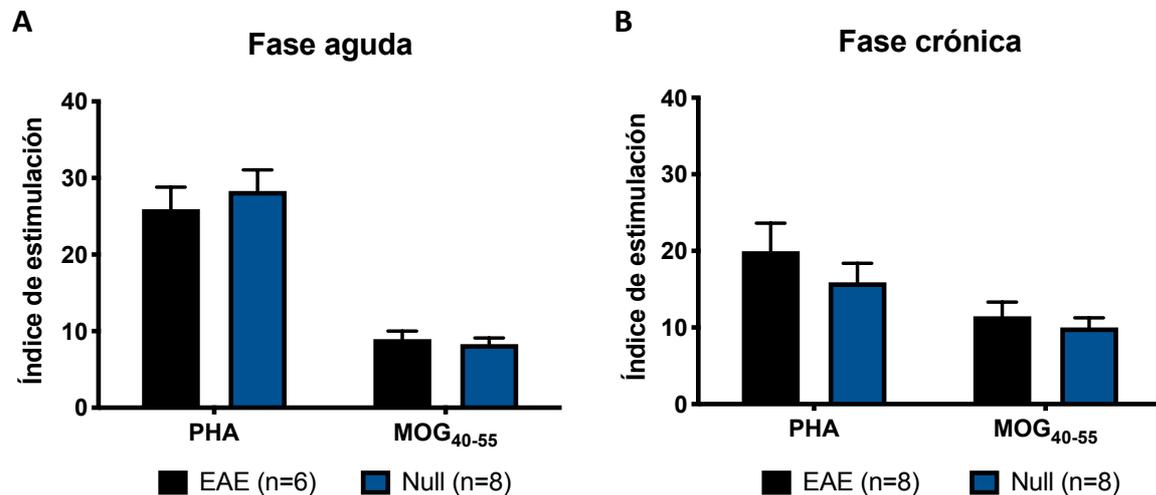


Figura 25.- Respuesta proliferativa inespecífica (PHA) y antígeno-específica (MOG₄₀₋₅₅) de los esplenocitos en la fase aguda (A) y la fase crónica (B) de animales tratados con AAV8.Null. Los datos se representan como la media ± SEM.

Por último, estudiamos posibles efectos de la administración de vectores AAVs en el SNC. Para ello, se extrajo la médula espinal de los ratones al final de experimento (día 27 p.i) y se evaluó la inflamación (tinción HE) y desmielinización (tinción KB). Como se observa en la figura 26, el grupo null no presentó diferencias a nivel de inflamación ni desmielinización en el SNC respecto al grupo EAE. Con los resultados obtenidos se pudo concluir, que la administración preventiva de vectores virales AAVs no producía alteraciones clínicas, inmunológicas e histológicas en el modelo animal de EAE.

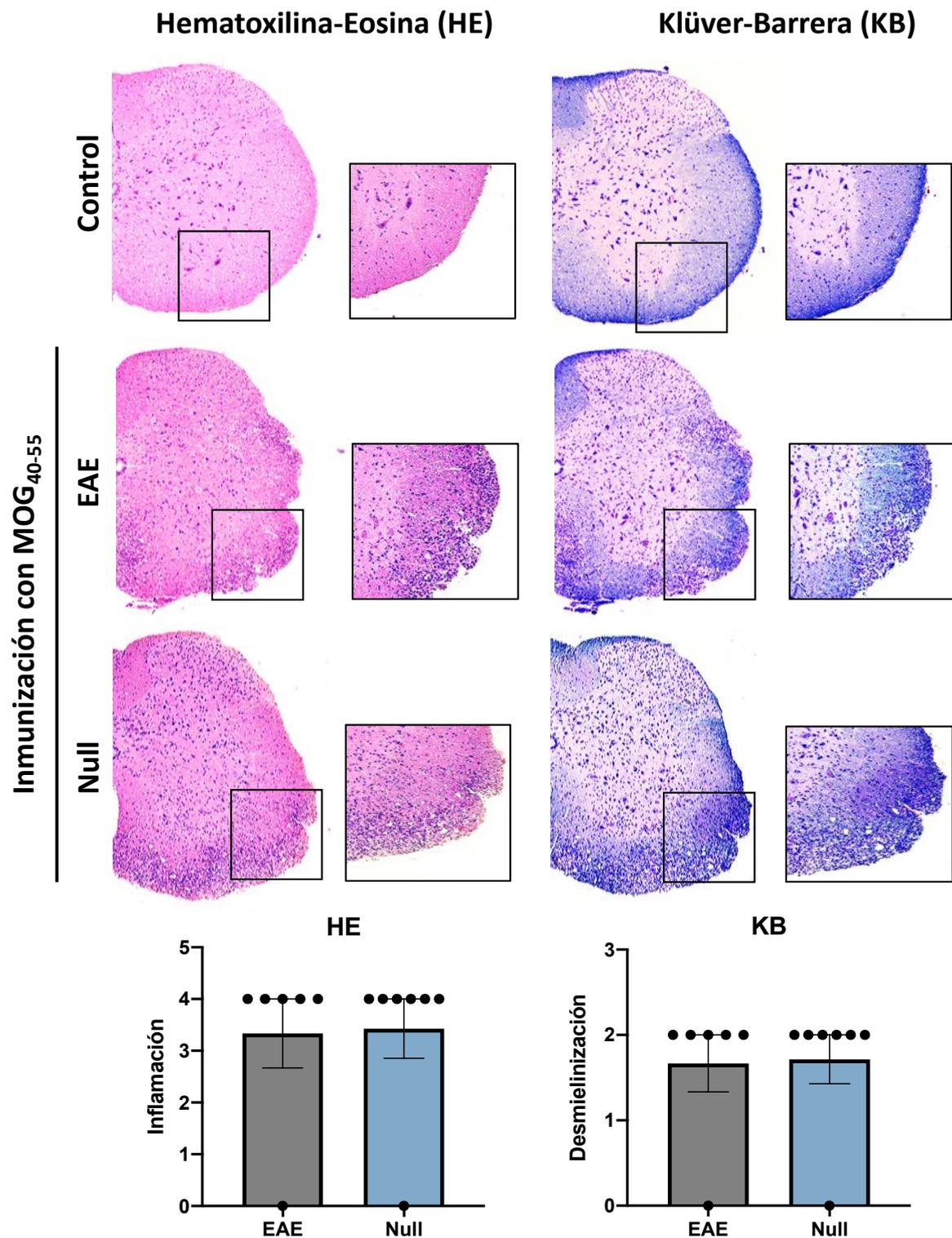


Figura 26.- Valoración del grado de inflamación y desmielinización en la médula espinal. Cada imagen pertenece a un animal representativo de la media del grupo para esa tinción. Null (n=7), EAE (n=6). Control: médula espinal de animal inmunizado con solución salina en vez de con el péptido encefalitogénico que no presenta sintomatología clínica ni afectación histopatológica. Los datos se representan como la media \pm SEM.

1.3.3.- Estudio del potencial terapéutico del tratamiento preventivo con AAV8.CMV.sIL21R

Para valorar si el bloqueo selectivo de la IL-21 mediante el tratamiento con vectores AAVs que codificaban para el sIL-21R permitía proteger del desarrollo de la EAE, se administró una dosis viral de $5 \cdot 10^{11}$ gv/animal de AAV8.CMV.sIL21R o de AAV8.Null control a los ratones 21 días antes de la inmunización con MOG₄₀₋₅₅. Los resultados que se presentan a continuación pertenecen a dos experimentos independientes, los cuales arrojaron resultados clínicos muy similares.

El grupo experimental tratado con el sIL-21R presentó una clínica significativamente más leve que la del control tratado con el vector null (Figura 27A), lo cual se manifestó en una menor área bajo la curva (AUC) de la puntuación clínica y menor puntuación clínica máxima. Esta mejora clínica se debía a una disminución significativa del número de animales que desarrollaba la enfermedad, sugiriendo que el tratamiento estaba actuando en un punto muy inicial del desarrollo de la respuesta inmune. El grupo terapéutico también presentó una tendencia a una menor pérdida de peso respecto al grupo control (Figura 27B), aunque la diferencia no alcanzaba la significación estadística (Tabla 12). Al analizar las variables clínicas únicamente de los animales incidentes, el grupo terapéutico no presentaba una mejora de éstas respecto al grupo control (Tabla 13), lo que estaba indicando que el efecto terapéutico observado se producía a nivel de desarrollo de los signos clínicos pero una vez establecidos éstos no los modificaba.

Tabla 12.- Parámetros clínicos del tratamiento preventivo con AAV8.CMV.sIL21R

| Grupo experimental | Incidencia | Puntuación clínica (AUC) | Puntuación clínica máxima | Variación de peso (AUC) |
|--------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Null | 17 /18 (94,44 %) | 51,50 ± 7,04 | 3,97 ± 0,31 | -56,37 ± 46,43 |
| sIL-21R | 11 / 19 (57,89 %) | 30,35 ± 6,88 | 2,37 ± 0,50 | 48,23 ± 45,80 |
| p - valor | 0,019 | 0,015 | 0,020 | 0,118 |

Los datos se presentan como la media ± SEM. AUC: área bajo la curva.

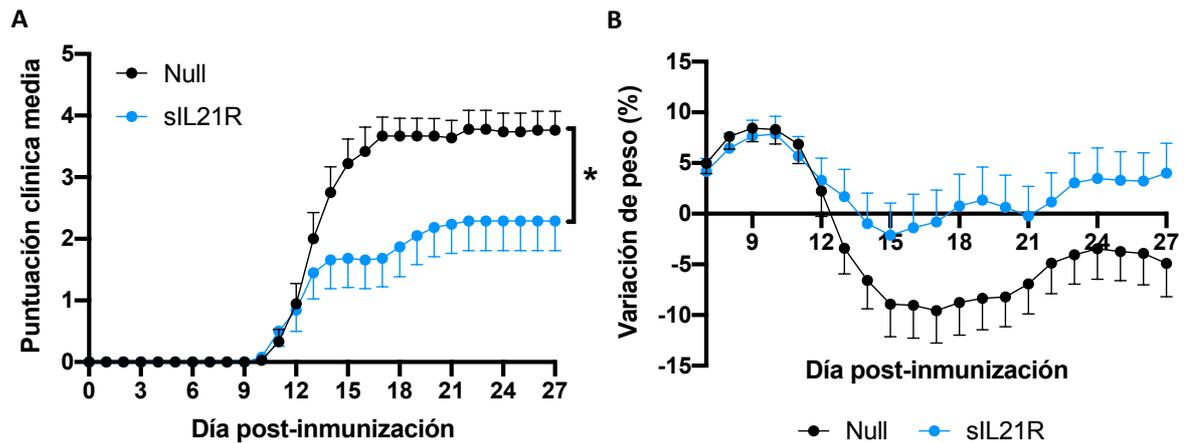


Figura 27.- Resultados clínicos del tratamiento preventivo con AAV8.CMV.sIL21R. Seguimiento de la evolución clínica (A) y variación porcentual del peso (B) del grupo sIL-21R (n=19) y grupo control null (n=18). Los datos se representan como la media \pm SEM. * ($p < 0,05$)

Tabla 13.- Parámetros clínicos de los animales incidentes del tratamiento preventivo con AAV8.CMV.sIL21R

| Grupo experimental | Puntuación clínica (AUC) | Día de inicio | Variación de peso (AUC) |
|--------------------|--------------------------|------------------|-------------------------|
| Null | 54,71 \pm 3,58 | 12,76 \pm 0,43 | -71,11 \pm 46,70 |
| sIL-21R | 52,66 \pm 5,60 | 13,27 \pm 0,98 | 37,04 \pm 63,56 |
| p - valor | 0,826 | 0,598 | 0,404 |

Los datos se presentan como la media \pm SEM. AUC: área bajo la curva.

Para validar que los resultados clínicos observados en los experimentos *in vivo* se debían, efectivamente, a la expresión de los vectores virales, se extrajo el RNA hepático y se cuantificó la expresión del receptor soluble. La figura 28A muestra que el grupo terapéutico expresaba eficientemente el transgén hasta final de experimento (48 días post-administración de los vectores virales). Además, dos muestras provenientes de la amplificación por qPCR fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa para comprobar que el producto de amplificación presentaba el tamaño molecular esperado (Figura 28B).

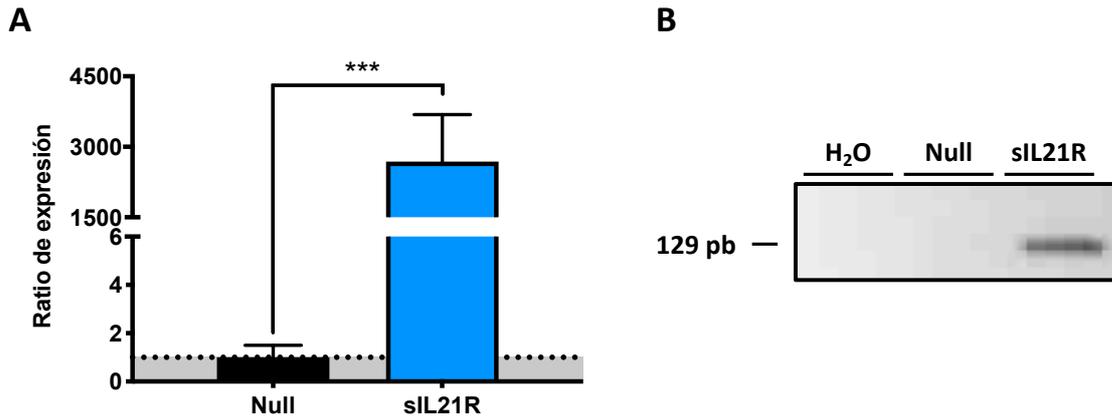


Figura 28.- Expresión hepática del gen terapéutico. Cuantificación por qPCR de la expresión hepática del vector AAV8.CMV.sIL21R (n=19). Los datos se representan como la ratio \pm SEM, normalizada respecto al grupo control null (n=18) (A). Producto de amplificación en gel de agarosa (B). *** (p<0,001)

1.3.4.- Estudio histopatológico del SNC de animales tratados con AAV8.CMV.sIL21R

A los animales de uno de los dos experimentos preventivos realizados se les extrajo la médula espinal a final de experimento (día 27 p.i) para realizar un estudio histopatológico del SNC. Para ello se hicieron marcajes por inmunofluorescencia para cuantificar: desmielinización (MBP), activación de la microglía (LEA), astrogliosis reactiva (GFAP), daño axonal (SMI-32) e infiltración de células T (CD3). Como se aprecia en la figura 29, los animales tratados con sIL-21R presentaban una menor desmielinización, activación de la microglía, daño axonal e infiltración de células T. Sin embargo, a pesar de apreciarse una tendencia a una disminución de la activación astrocitaria, las diferencias no eran estadísticamente significativas (Tabla 14). Al analizar únicamente los datos de aquellos animales que habían sido incidentes (Null n=7, sIL-21R n=4), se pudo constatar una leve mejoría clínica a nivel histopatológico en el grupo tratado con sIL-21R (datos no mostrados).

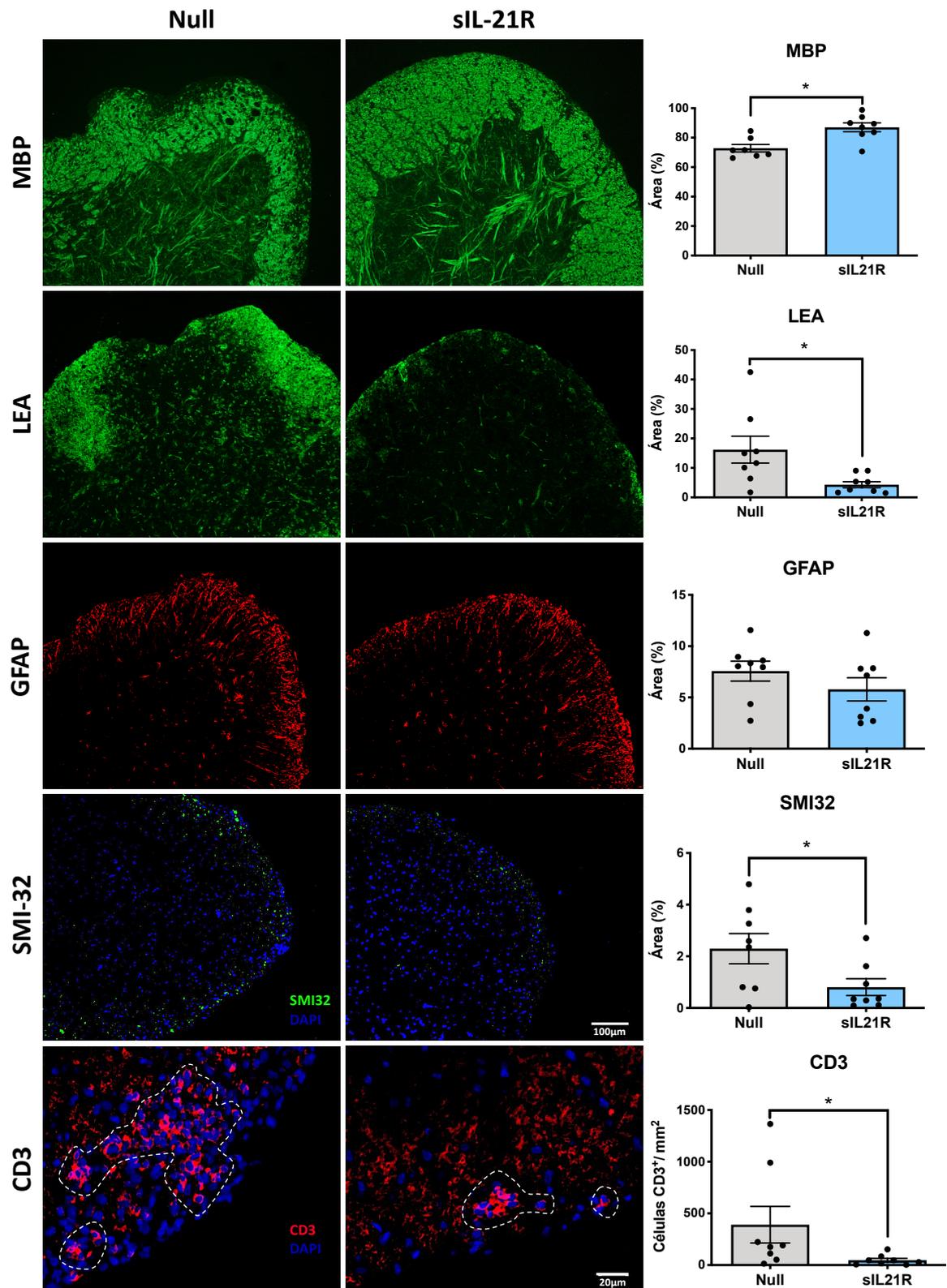


Figura 29.- Estudio histopatológico del tratamiento preventivo con AAV8.CMV.sIL21R. Cada imagen pertenece a un animal representativo de la media del grupo para ese marcaje. Los marcajes MBP, LEA, GFAP y SMI-32 tienen la misma escala. El marcaje de las células T CD3⁺ se ha delimitado con una línea de puntos. sIL-21R (n=8), null (n=8). Los datos se representan como la media \pm SEM. * (p<0,05)

Tabla 14.- Cuantificación de marcajes inmunohistopatológicos

| Grupo experimental | MBP (% área) | LEA (% área) | GFAP (% área) | SMI-32 (% área) | CD3 (células/mm ²) |
|--------------------|--------------|--------------|---------------|-----------------|--------------------------------|
| Null | 75,03 ± 3,11 | 16,19 ± 4,56 | 7,57 ± 0,98 | 2,30 ± 0,59 | 390,20 ± 177,30 |
| sIL-21R | 87,05 ± 3,00 | 4,31 ± 1,20 | 5,79 ± 1,13 | 0,81 ± 0,33 | 47,21 ± 17,55 |
| p - valor | 0,015 | 0,017 | 0,253 | 0,043 | 0,015 |

Los datos se presentan como la media ± SEM.

1.3.5.- Estudio del perfil inmunológico de los animales tratados con AAV8.CMV.sIL21R

Una vez valorado el potencial terapéutico del tratamiento, se decidió analizar el efecto que tenía el bloqueo de la IL-21 a nivel inmunológico. Para ello, además de las muestras obtenidas en fase crónica (día 27 p.i) se realizaron nuevos experimentos en los que los animales se eutanasiaron en fase aguda de la enfermedad (día 15 p.i).

1.3.5.1.- Análisis de expresión génica de marcadores de poblaciones de células T y citoquinas

Para conocer si el tratamiento con AAV8.sIL21R estaba induciendo un cambio en la respuesta inmune, se estudió por qPCR tanto la expresión de diferentes citoquinas anti- y pro-inflamatorias (TGF β 1, IL-4, IL-10, IFN γ e IL-17A) como de factores de transcripción específicos de las distintas poblaciones de células T implicadas en la patogenia de la EAE: *Rorc2* (isoforma 2 del factor ROR γ t específico de la población Th17), *Tbx21* (factor T-BET específico de la población Th1), *Foxp3* (factor FOXP3 específico de la población Tregs) y *Gata3* (factor GATA3 específico de la población Th2).

La expresión de los diferentes genes en los esplenocitos y la médula espinal se valoró en fase aguda (día 15 p.i) dado que es el punto temporal del curso clínico en el que se produce una mayor respuesta inmune. En el bazo se observó que los animales tratados con el AAV8.sIL21R tenían una mayor expresión de *Tbx21*, *Gata3* y *TGF β 1*. Sorprendentemente, no había alteración de la expresión de *Rorc2* indicando que no se estaba produciendo una inmunoregulación de la vía Th17. Para el resto de las citoquinas no pudo detectarse su expresión (Figura 30A). Al valorar la expresión en médula espinal

no se observaron diferencias de expresión entre el grupo terapéutico y el grupo control (Figura 30B), indicándonos, como se había hipotetizado, que el tratamiento estaba ejerciendo su efecto a nivel periférico.

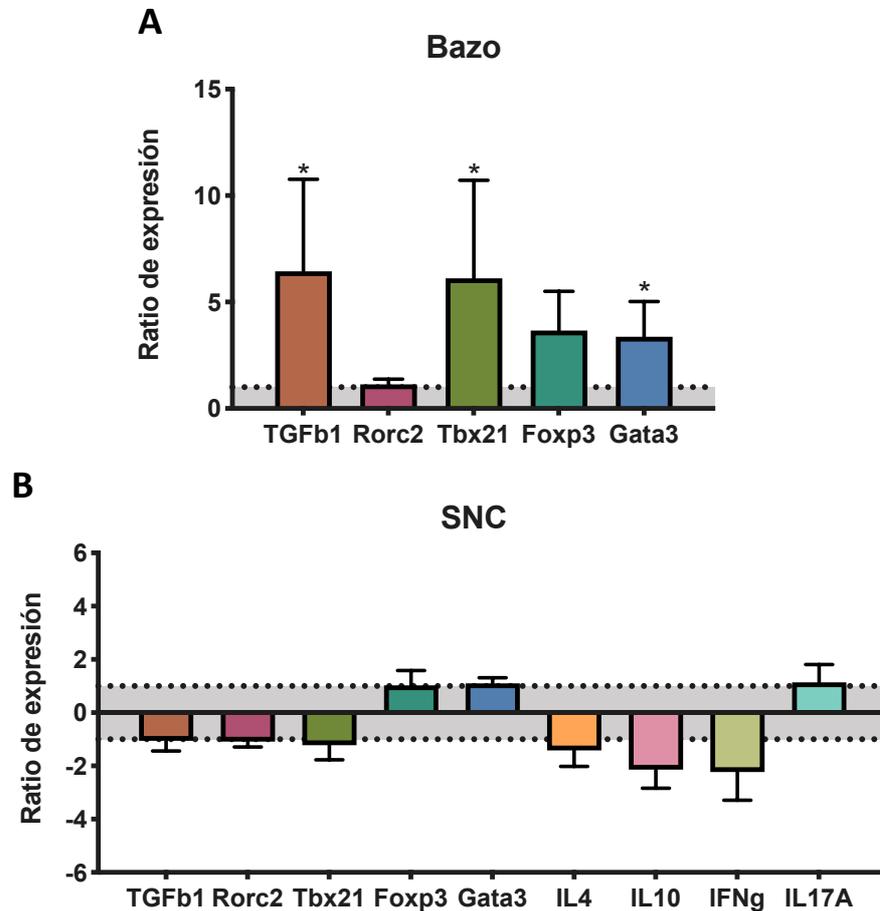


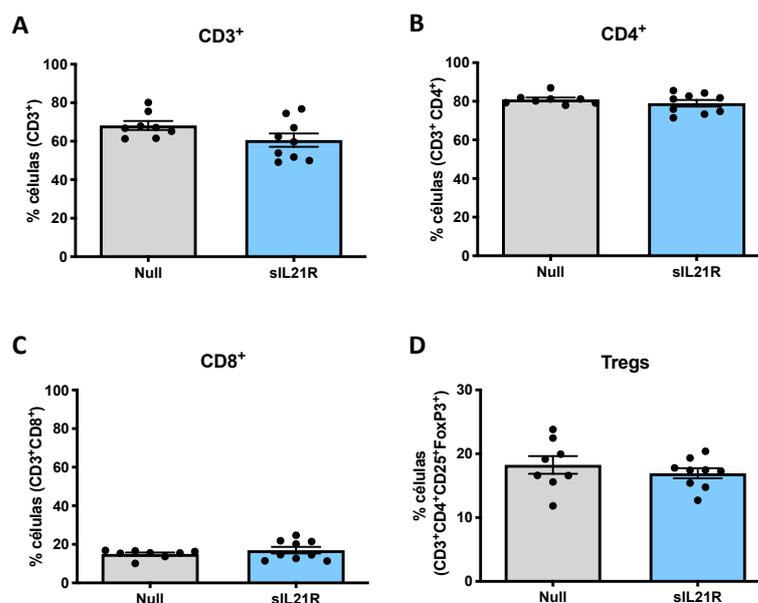
Figura 30.- Perfil de expresión de genes representativos de diferentes poblaciones inmunes y de citoquinas en fase aguda. Resultados de expresión obtenidos en el bazo (A) y en la médula espinal (B). sIL-21R (n=7), null (n=8). Los datos se representan como las ratios \pm SEM, normalizados respecto al grupo null. * ($p < 0,05$)

Al valorar la expresión de los mismos genes en los esplenocitos en fase crónica, no se apreciaron diferencias de expresión entre ambos grupos. Inclusive, la expresión del gen *Rorc2* ya no era detectable en esta fase clínica (datos no mostrados). Por lo que, la inmunomodulación ejercida por el tratamiento preventivo con el sIL-21R era apreciable en fase aguda, pero no en la fase crónica de la enfermedad.

1.3.5.2.- Análisis de poblaciones inmunes y citoquinas por citometría de flujo

Con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos mediante expresión génica y completar el perfil inmunológico de los animales tratados con el AAV8.sIL21R, se analizaron en esplenocitos diferentes poblaciones linfoides y la producción de las citoquinas más importantes implicadas en el proceso patogénico de la EAE, para así identificar el mecanismo o mecanismos implicados en la mejora clínica con el tratamiento. En la fase crónica (día 27 p.i), los animales tratados con sIL-21R presentaron una tendencia a tener una menor frecuencia de linfocitos T (CD3⁺) (Null: $68,20 \pm 2,31$; sIL-21R: $60,59 \pm 3,47$; $p = 0,096$). Respecto a las poblaciones de células T CD4⁺ (CD3⁺ CD4⁺), T CD8⁺ (CD3⁺ CD8⁺) y Tregs (CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) no se apreciaron diferencias respecto al control. En cuanto al patrón de producción de citoquinas tampoco se apreciaron diferencias en los porcentajes de células IL-17⁺ (CD3⁺ CD4⁺ IL-17⁺), IFN γ ⁺ (CD3⁺ CD4⁺ IFN γ ⁺; CD3⁺ CD8⁺ IFN γ ⁺) e IL-4⁺ (CD3⁺ CD4⁺ IL-4⁺) respecto al grupo control. Sin embargo, los animales tratados con AAV8.sIL21R presentaban un porcentaje significativamente menor de células IL-10⁺ (CD3⁺ CD4⁺ IL-10⁺) (Null: $1,64 \pm 0,19$; sIL-21R: $1,46 \pm 0,16$; $p = 0,028$) (Figura 31).

Células T (Fase crónica)



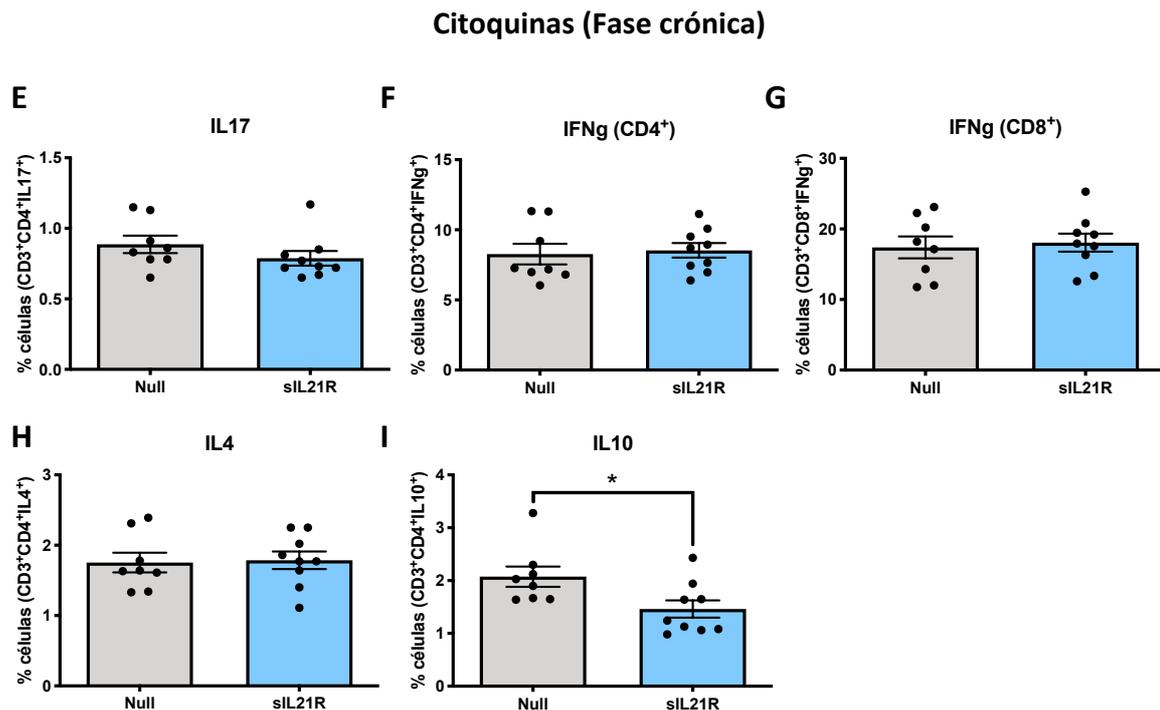
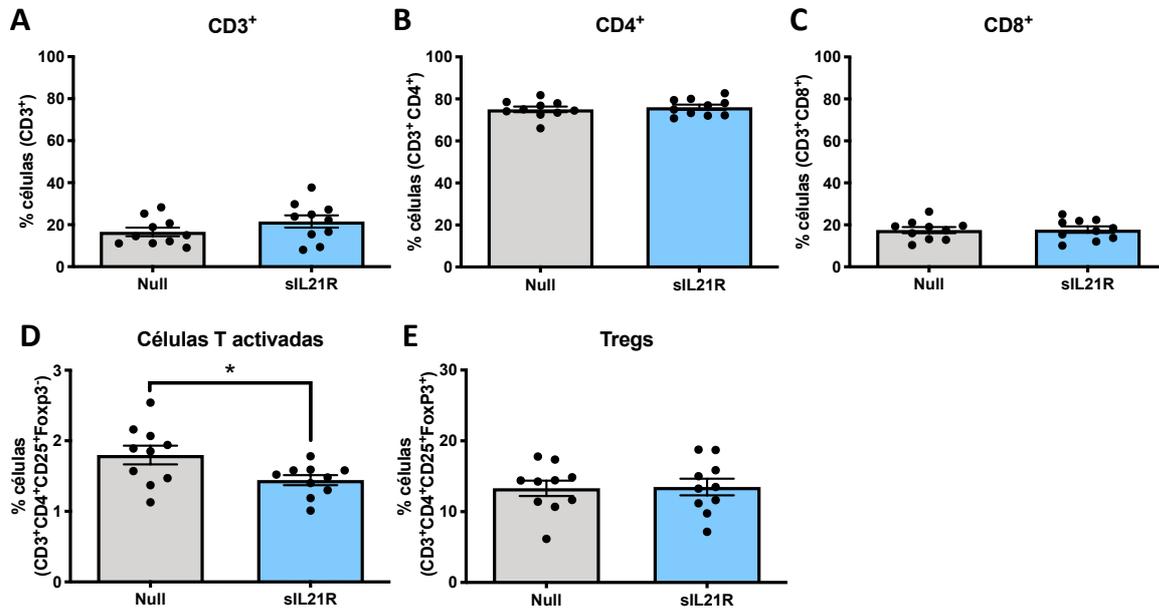


Figura 31.- Porcentaje de células T (A-D) y de células T productoras de diversas citoquinas (E-I) en esplenocitos durante la fase crónica en animales tratados con AAV8.CMV.siL21R. siL-21R (n=9), null (n=8). Los datos se representan como la media \pm SEM. * ($p < 0,05$)

Durante la fase aguda (día 15 p.i), no se observaron diferencias en las poblaciones de células T CD3⁺, T CD4⁺, T CD8⁺ y Tregs entre el grupo terapéutico y el control. Sin embargo, se observó que el grupo terapéutico presentaba un menor porcentaje de células T CD4⁺ activadas (CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺, Foxp3⁻) (Null: $1,80 \pm 0,13$; siL-21R: $1,44 \pm 0,07$; $p = 0,029$). El estudio de poblaciones celulares productoras de citoquinas no reveló ninguna diferencia entre el grupo terapéutico y el control (Figura 32).

También se analizaron las poblaciones de células NK, macrófagos, células B y DCs. Al analizar la población de células NK se observó que el grupo terapéutico presentaba un menor porcentaje de células NK activadas (NK1.1⁺ CD3⁻ CD69⁺) (Null: $17,28 \pm 1,08$; siL-21R: $14,07 \pm 0,97$; $p = 0,040$). Sin embargo, en el resto de las poblaciones de células NK totales [NK (NK1.1⁺ CD3⁻), NKT (NK1.1⁺ CD3⁺) y NKT activadas (NK1.1⁺ CD3⁺ CD69⁺)] no se observaron diferencias respecto al grupo control. Tampoco se apreciaron diferencias en el porcentaje de las diferentes poblaciones de células B totales [B (B220⁺), B activadas (B220⁺ MHCII⁺) y Breg (B220⁺ CD1d^{high} CD5⁺)] ni en el porcentaje de macrófagos (F4/80⁺ CD11b⁺) (Figura 33).

Células T (Fase aguda)



Citoquinas (Fase aguda)

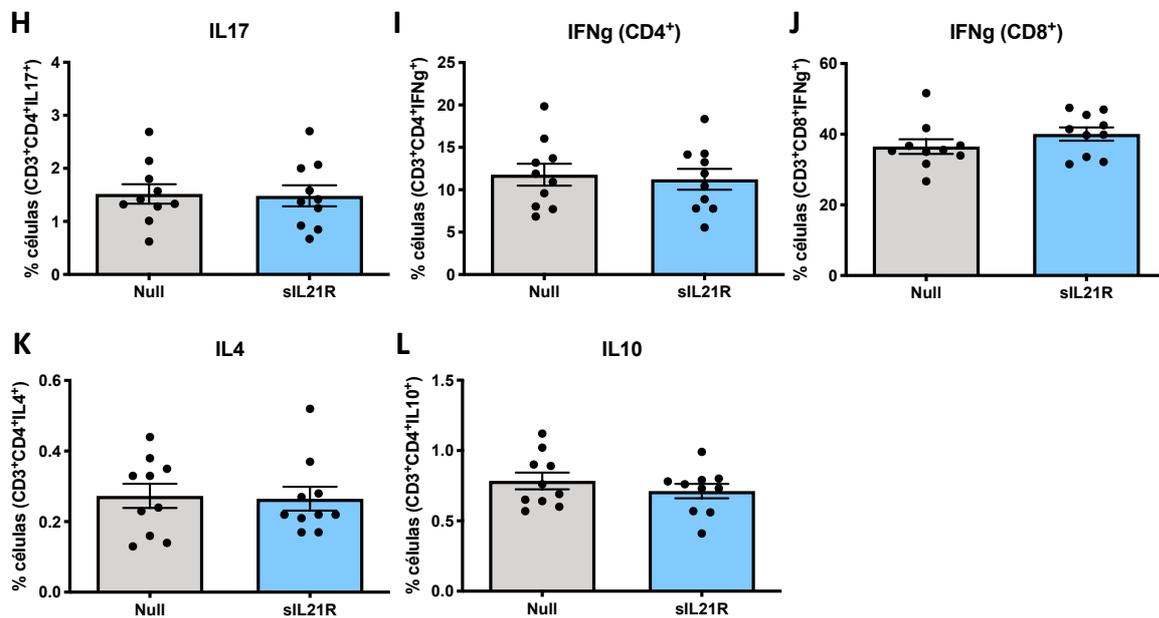


Figura 32.- Porcentaje de células T (A-E) y de células T productoras de diversas citoquinas (H-L) en esplenocitos durante la fase aguda en animales tratados con AAV8.CMV.siL21R. siL-21R (n=10), null (n=10). Los datos se representan como la media ± SEM. * (p<0,05)

Macrófagos y células NK (Fase aguda)

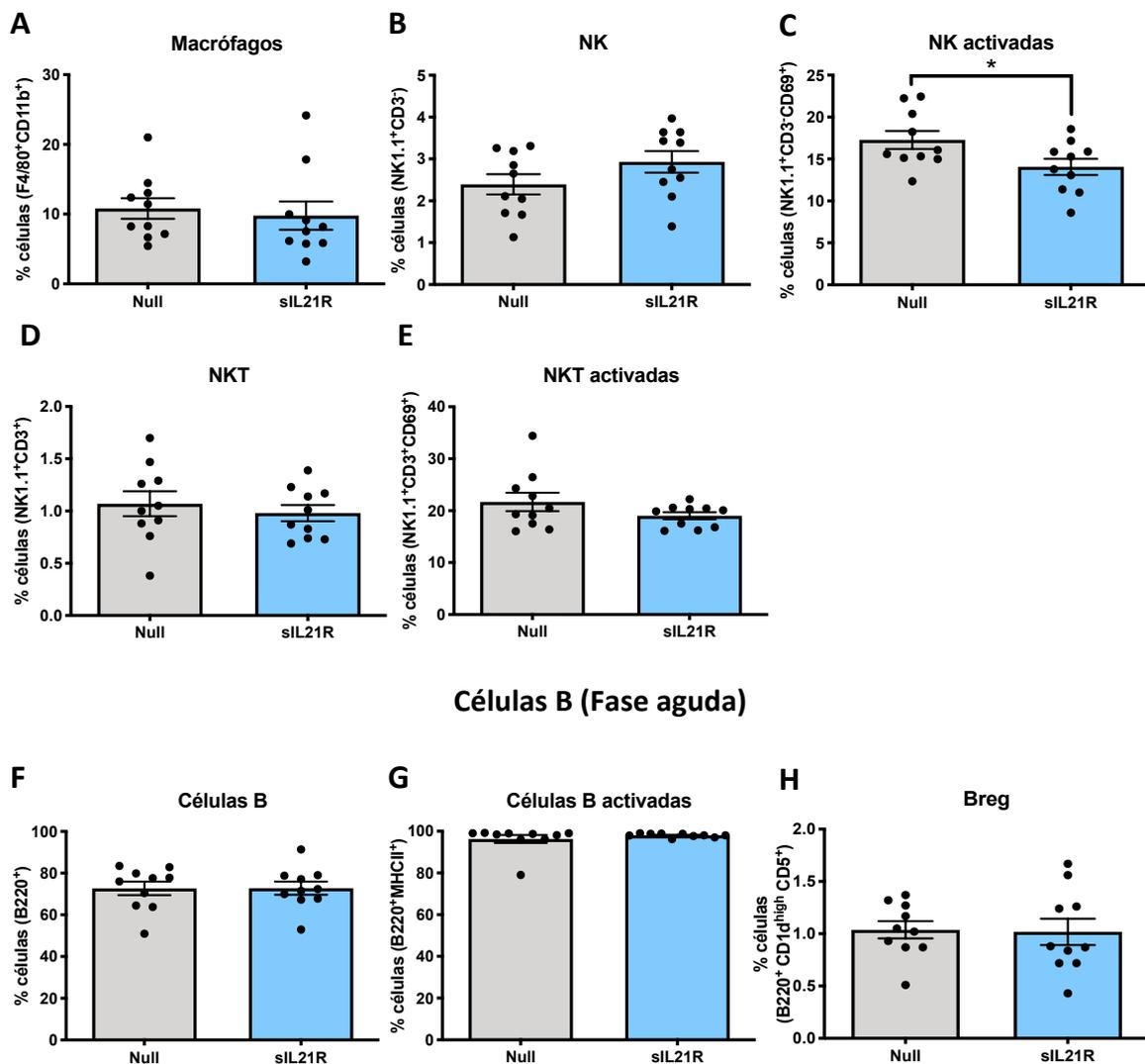
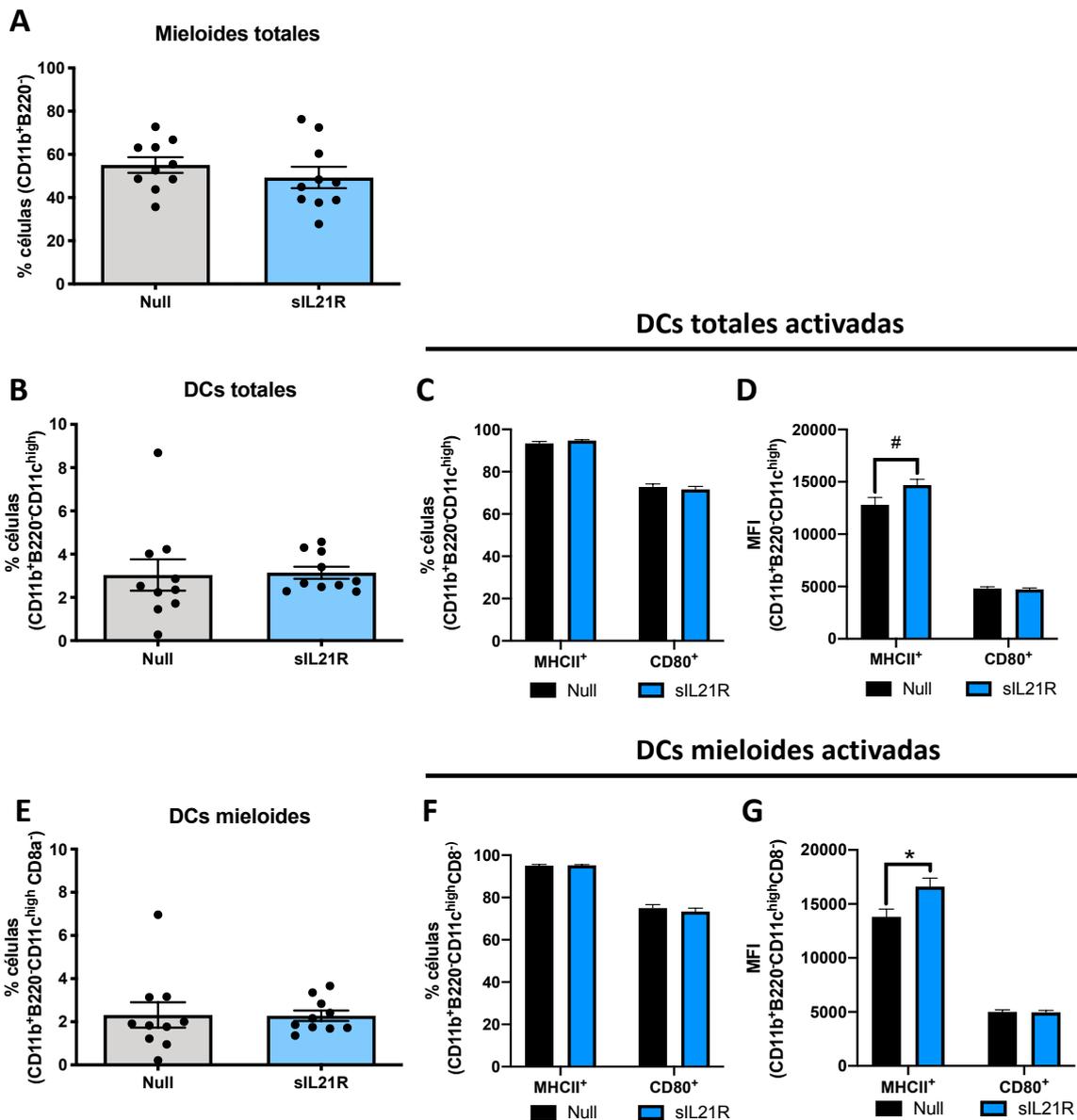


Figura 33.- Porcentaje de macrófagos (A), células NK (B-E) y células B (F-H) en esplenocitos durante la fase aguda en animales tratados con AAV8.CMV.sIL21R. sIL-21R (n=10), null (n=10). Los datos se representan como la media \pm SEM. * ($p < 0,05$)

Respecto a las DCs, no se observaron diferencias en el porcentaje de células mieloides totales (CD11b⁺ B220⁻), DCs totales (DCs mieloides + DCs linfoides) (CD11b⁺ B220⁻ CD11c^{high}), DCs mieloides (CD11b⁺ B220⁻ CD11c^{high} CD3⁻) y DCs linfoides (CD11b⁺ B220⁻ CD11c^{high} CD3⁺). Sin embargo, el grupo tratado con sIL-21R presentaba una mayor activación de las DCs mieloides, lo cual se apreciaba en un incremento de la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) del marcador MHC II⁺ (Null: 13816,00 \pm 716,20; sIL-21R: 16603,00 \pm 780,20; $p = 0,017$) y un mayor porcentaje de DCs linfoides activadas (CD11b⁺ B220⁻ CD11c^{high} CD3⁺ MHC II⁺) (Null: 87,67 \pm 1,74; sIL-21R: 92,19 \pm 0,81;

p = 0,031). En el grupo terapéutico también se observó una tendencia a una mayor activación de las DCs totales debido a un incremento de la MFI de MHC II⁺ (Null: 12802,00 ± 714,10; siL-21R: 14686,00 ± 553,20; p = 0,052). Finalmente, no se observaron diferencias ni en el porcentaje de células CD80⁺ ni en la MFI de este marcador en ninguna de las poblaciones de DCs (Figura 34).

Células dendríticas (Fase aguda)



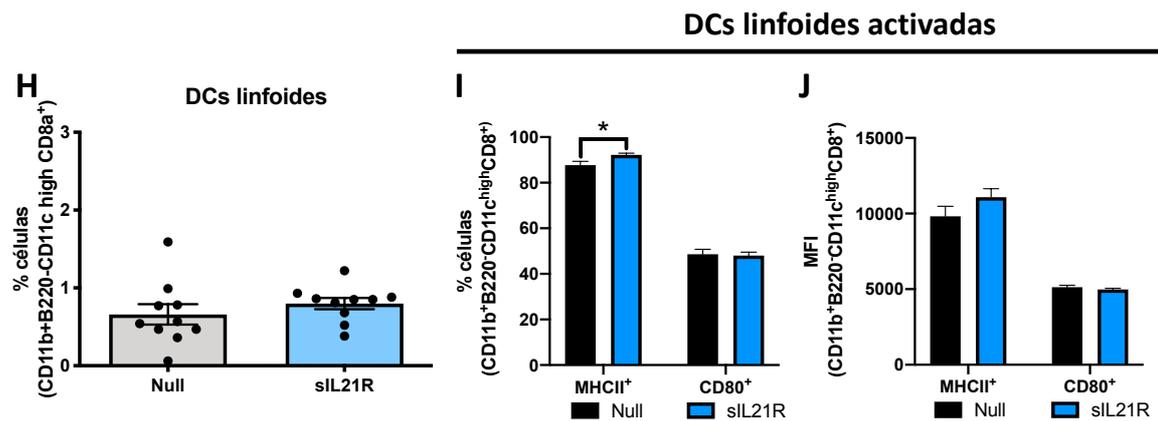


Figura 34.- Porcentaje de células mieloides totales (A), DCs (B,E,H) y activación de DCs (C,D,F,G,I,J) en esplenocitos durante la fase aguda en animales tratados con AAV8.CMV.sIL21R. sIL-21R (n=10), null (n=10). Los datos se representan como la media \pm SEM. # (p<0,06), * (p<0,05)

1.3.5.3.- Estudio de la respuesta proliferativa de esplenocitos

Se estudió la respuesta proliferativa de los esplenocitos en la fase aguda (día 15 p.i) y la fase crónica (día 27 p.i), sin observarse diferencias ni en la proliferación policlonal (PHA) ni antígeno-específica (MOG₄₀₋₅₅) en los ratones tratados con el vector terapéutico respecto a los ratones control (Figura 35).

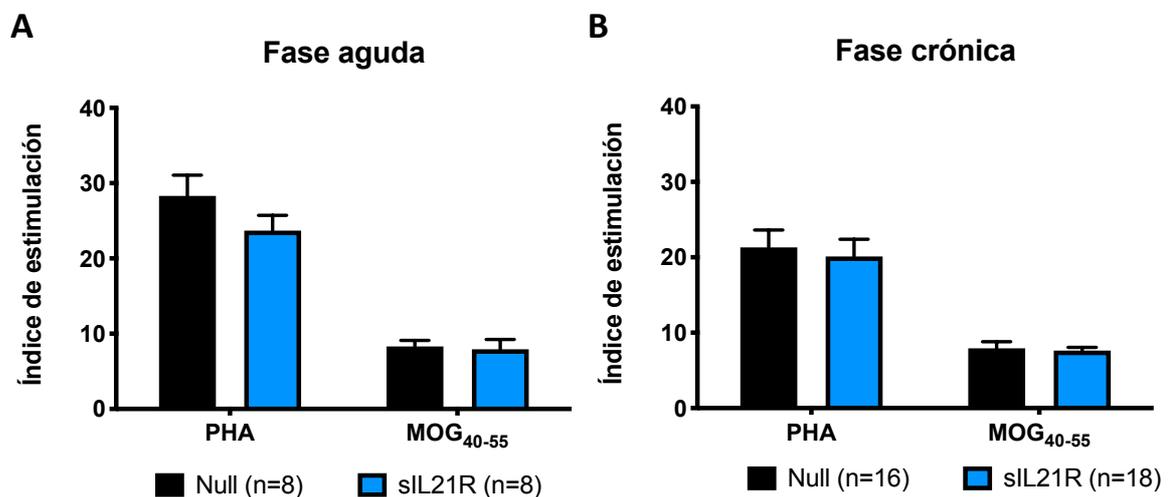


Figura 35.- Respuesta proliferativa inespecífica (PHA) y antígeno-específica (MOG₄₀₋₅₅) de los esplenocitos en la fase aguda (A) y la fase crónica (B) de animales tratados con AAV8.CMV.sIL21R. Los datos se representan como la media \pm SEM.

1.3.5.4.- Análisis del perfil de secreción de citoquinas en el SN del cultivo de esplenocitos

Mediante la tecnología Luminex Magpix se analizó el perfil de secreción de citoquinas (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 y Treg) en el SN de los esplenocitos estimulados con el péptido encefalitogénico en fase aguda (día 15 p.i) y fase crónica (día 27 p.i).

En fase aguda, el grupo tratado con sIL-21R no presentaba diferencias significativas respecto al grupo control. Sin embargo, en fase crónica se observó que el grupo terapéutico presentaba unos niveles significativamente mayores de TNF α (Null: 23,99 \pm 2,99; sIL-21R: 36,36 \pm 4,16; p = 0,032) y de IL-18 (Null: 719,20 \pm 111,40; sIL-21R: 1095,00 \pm 129,30; p = 0,046). También se pudo apreciar una tendencia al aumento de IFN γ (Null: 196,70 \pm 46,02; sIL-21R: 418,00 \pm 95,69; p = 0,060). En el resto de las citoquinas analizadas no se observaron diferencias entre los grupos experimentales (Figura 36).

Dado que, sorprendentemente, las diferencias significativas se encontraron en las citoquinas de carácter pro-inflamatorio se analizó si había diferencias entre los animales incidentes (n=5) y no incidentes (n=4) del grupo terapéutico. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias apreciables, comportándose el grupo terapéutico de manera homogénea independientemente de la clínica desarrollada: TNF α (sIL-21R incidentes: 37,72 \pm 3,85; sIL-21R no incidentes: 34,66 \pm 8,80; p = 0,740), IL-18 (sIL-21R incidentes: 1113,00 \pm 146,40; sIL-21R no incidentes: 1073,00 \pm 253,60; p = 0,890). No se pudieron valorar las siguientes citoquinas por encontrarse la mayoría de las muestras analizadas por debajo del límite de detección: TGF β 1, IL-12p70, IL-5, IL-23, IL-27 e IL-9, ello imposibilitó confirmar a nivel proteico el aumento de expresión génica de TGF β 1 observado en el grupo terapéutico.

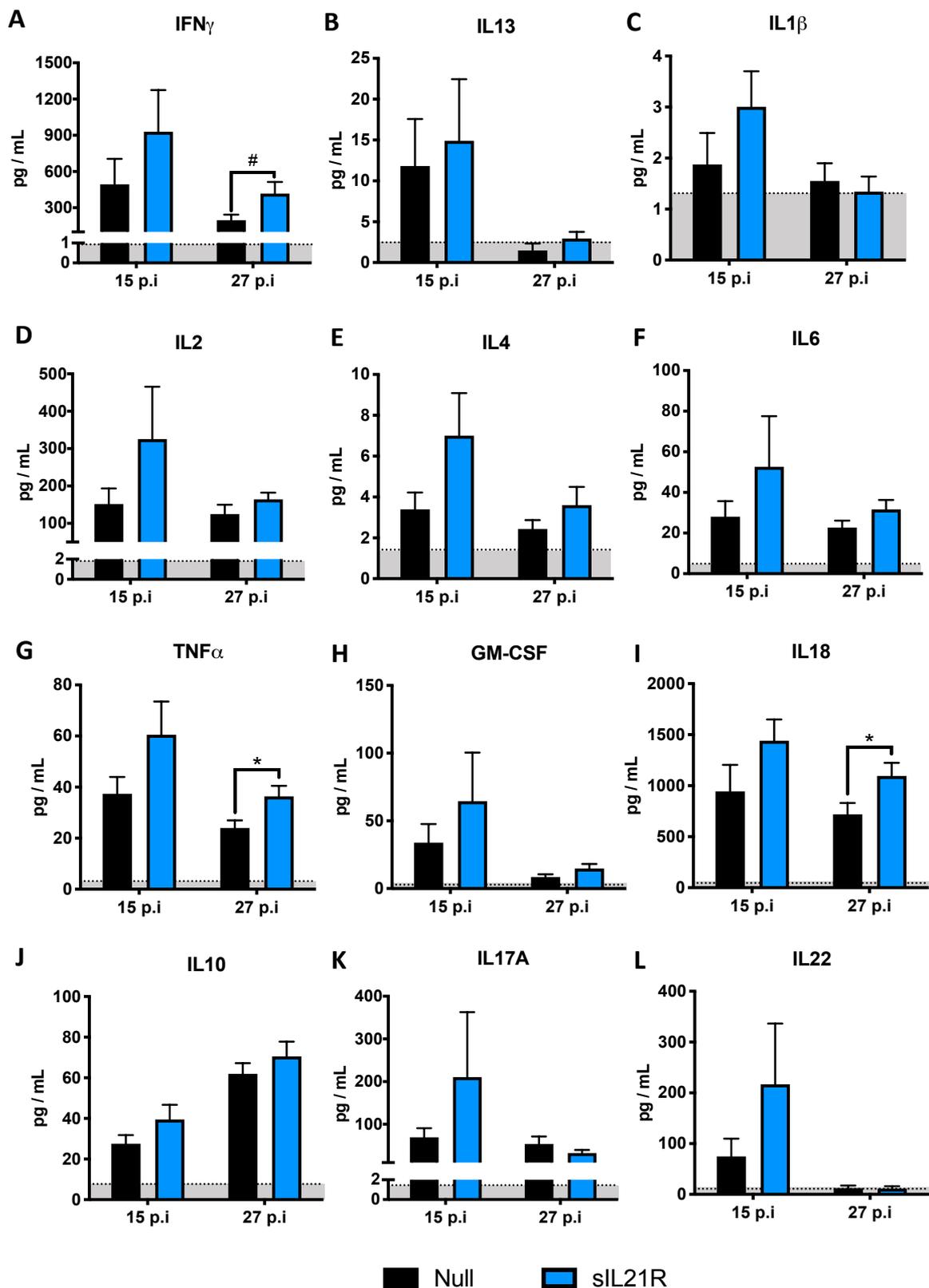


Figura 36.- Concentración de citoquinas detectadas en el SN de esplenocitos estimulados con MOG₄₀₋₅₅ de animales tratados con AAV8.CMV.sIL21R. Fase aguda (15 p.i): sIL-21R (n=8), null (n=8). Fase crónica (27 p.i): sIL-21R (n=9), null (n=8). Las zonas sombreadas indican el límite de detección para cada citoquina. Los datos se representan como la media \pm SEM. # (p<0,06), * (p<0,05)

1.4.- Aproximación terapéutica temprana con AAV8.CAG.sIL21R en el modelo murino de EAE

1.4.1.- Diseño experimental

Una vez comprobada la eficacia clínica del bloqueo de la IL-21 sobre el desarrollo de la EAE en una aproximación preventiva, se decidió comprobar la capacidad terapéutica del tratamiento una vez establecidos los signos clínicos de la enfermedad.

Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio indicaron que la administración de vectores virales una vez realizada la inducción de la EAE conllevaba una reducción significativa de la expresión del transgén (Miralles et al., 2017). Teniendo en cuenta esta observación se decidió incluir tres modificaciones en el diseño experimental.

La primera supuso clonar el gen terapéutico del receptor soluble bajo el control del promotor CAG, el cual está descrito que *in vivo* presenta una mayor expresión hepática que el promotor CMV, lo que se traduce en una mayor producción de la proteína terapéutica (Nguyen et al., 2008). Además, debido al tamaño relativamente pequeño del gen codificante del sIL-21R era posible realizar el cambio de promotor sin comprometer el correcto empaquetamiento de los vectores virales. La segunda modificación consistió en duplicar la dosis viral administrada por vía i.v (10^{12} vg/animal) para asegurar así que el transgén se expresaba en niveles elevados una vez establecida la enfermedad. La tercera modificación consistió en variar el punto temporal de administración de los vectores virales. Atendiendo a la cinética de infección de un AAV, el cuál precisa de entre una y dos semanas para alcanzar su expresión máxima, se decidió administrar los vectores virales el día posterior a la inmunización (día +1). Sin embargo, al desconocer cuál podía ser el efecto que podía conllevar una administración de una dosis relativamente alta de vectores virales en animales a los que se les había activado el sistema inmune mediante los adyuvantes administrados durante la inmunización, se decidió introducir un nuevo grupo terapéutico al cual se le administraron los vectores virales el día previo a la inmunización (día -1) (Figura 37).

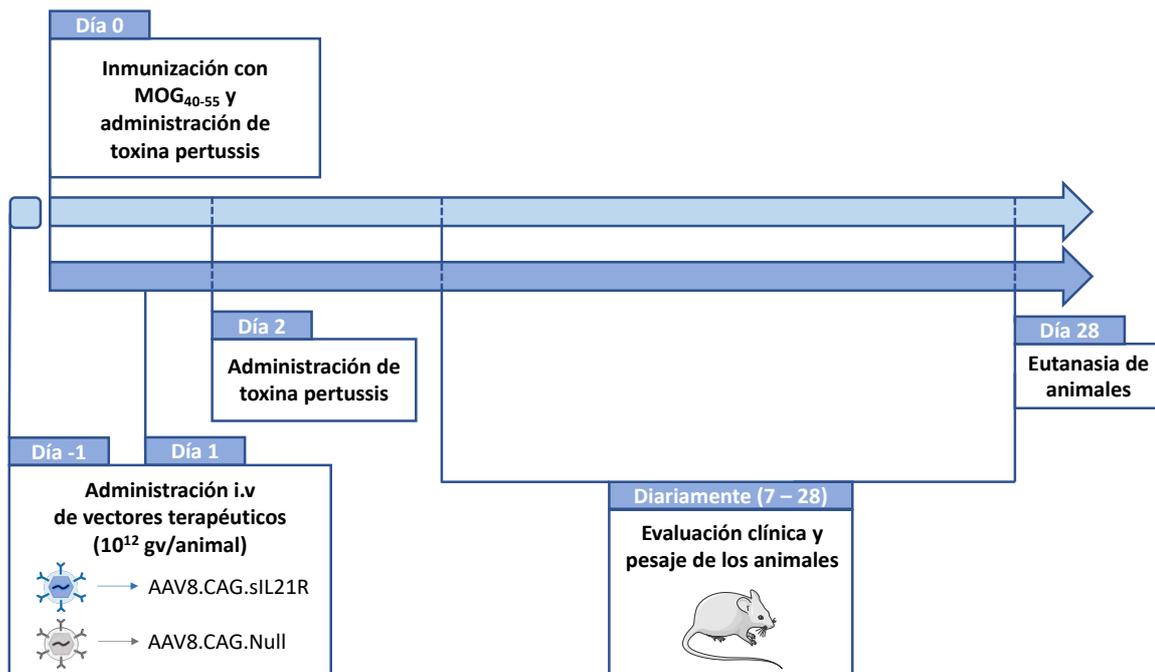


Figura 37.- Esquema del diseño experimental del abordaje terapéutico temprano en el modelo de EAE con AAVs codificantes del sIL-21R.

1.4.2.- Resultados clínicos del tratamiento terapéutico temprano con AAV8.CAG.sIL21R

Contrariamente a lo que se había observado al realizar una aproximación preventiva, el tratamiento con AAV8.CAG.sIL21R, tanto si era administrado a día -1 como a día +1, parecía producir un empeoramiento de la evolución clínica de la EAE, a pesar de que las diferencias respecto a sus respectivos grupos control no eran estadísticamente significativas cuando se tenían en cuenta en el análisis la globalidad de los animales, tanto los incidentes como los no incidentes.

Las variables clínicas fueron corroboradas por los resultados obtenidos al monitorizar la variación de peso que sufrían los animales a lo largo del experimento. A pesar de que las diferencias no eran estadísticamente significativas, se apreciaba una tendencia clara a que los animales tratados con AAV8.CAG.sIL21R presentaban una mayor pérdida de peso que la sufrida por los animales de sus respectivos grupos control (Tabla 15).

Tabla 15.- Parámetros clínicos del tratamiento terapéutico temprano con AAV8.CAG.sIL21R

| Grupo experimental | Incidencia | Puntuación clínica (AUC) | Variación de peso (AUC) |
|--------------------|------------------|--------------------------|-------------------------|
| Null (día -1) | 7 / 10 (70,00 %) | 20,04 ± 6,01 | 155,40 ± 50,84 |
| sIL-21R (día -1) | 7 / 10 (70,00 %) | 39,58 ± 10,10 | 17,80 ± 67,10 |
| p - valor | 1,000 | 0,143 | 0,119 |
| Null (día +1) | 6 / 9 (66,67 %) | 14,22 ± 5,45 | 154,10 ± 21,87 |
| sIL-21R (día +1) | 7 / 10 (70,00 %) | 24,99 ± 6,41 | 71,61 ± 43,00 |
| p - valor | 0,876 | 0,315 | 0,117 |

Los datos se presentan como la media ± SEM. AUC: área bajo la curva

Para valorar de una forma más clara el efecto sobre la severidad clínica se analizaron los resultados clínicos únicamente de los animales incidentes. Gracias a ello se pudo determinar que los animales del grupo tratado con sIL-21R presentaban una clínica significativamente más severa e incidían antes que su respectivo grupo control cuando el vector era administrado a día -1, lo cuál correlacionaba con una mayor pérdida de peso que el grupo null. En el caso de los animales tratados a día +1, las diferencias no fueron estadísticamente significativas, pero había una clara tendencia al empeoramiento en los animales tratados con sIL-21R (Tabla 16, Figura 38).

Tabla 16.- Parámetros clínicos de los animales incidentes.

| Grupo experimental | Puntuación clínica (AUC) | Puntuación clínica máxima | Día de inicio | Variación de peso (AUC) |
|--------------------|--------------------------|---------------------------|---------------|-------------------------|
| Null (día -1) | 28,63 ± 6,03 | 3,89 ± 0,15 | 19,43 ± 2,03 | 90,58 ± 46,55 |
| sIL21R (día -1) | 56,54 ± 7,62 | 4,32 ± 0,32 | 13,43 ± 0,65 | -83,73 ± 61,05 |
| p - valor | 0,011 | 0,367 | 0,016 | 0,042 |
| Null (día +1) | 21,33 ± 6,41 | 3,00 ± 0,45 | 18,33 ± 2,48 | 142,10 ± 32,37 |
| sIL21R (día +1) | 35,70 ± 4,92 | 3,36 ± 0,36 | 14,71 ± 2,36 | 25,89 ± 52,55 |
| p - valor | 0,138 | 0,478 | 0,125 | 0,099 |

Los datos se presentan como la media ± SEM. AUC: área bajo la curva.

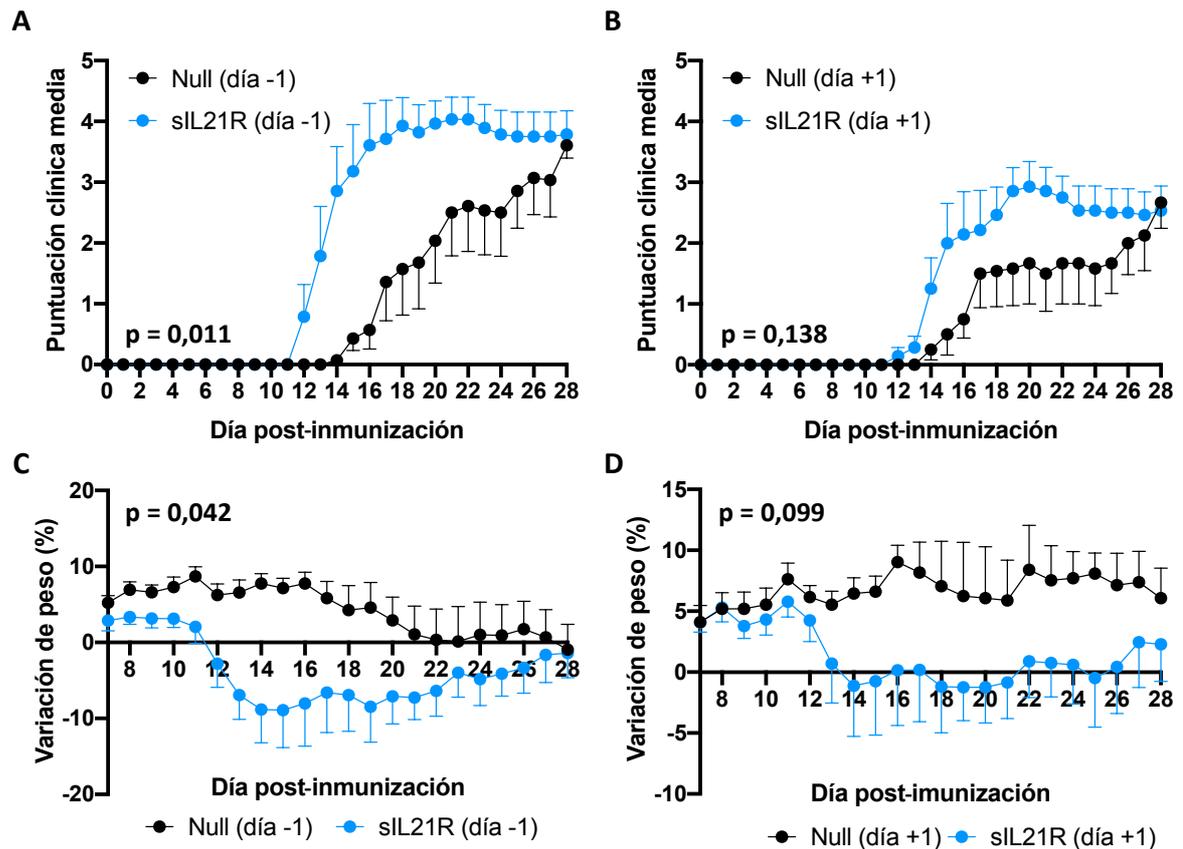


Figura 38.- Resultados clínicos de los animales incidentes del tratamiento terapéutico temprano con AAV8.CAG.sIL21R. Seguimiento de la evolución clínica (A,B) y la variación porcentual del peso (C,D) de los grupos administrados a día -1 p.i [sIL-21R (n=7), null (n=7)] y a día +1 p.i [sIL-21R (n=7), null (n=6)]. Los datos se representan como la media \pm SEM.

Para asegurar que los resultados previos no eran debidos a una baja expresión de la molécula terapéutica se analizó tanto la presencia de DNA viral como la expresión del gen terapéutico en muestras hepáticas de siete animales de cada grupo. Tal como se puede observar en la figura 39, en ambos grupos terapéuticos, tanto el administrado a día -1 como a día +1, se detectaron partículas virales infecciosas en hígado y éstas expresaban correctamente el gen terapéutico.

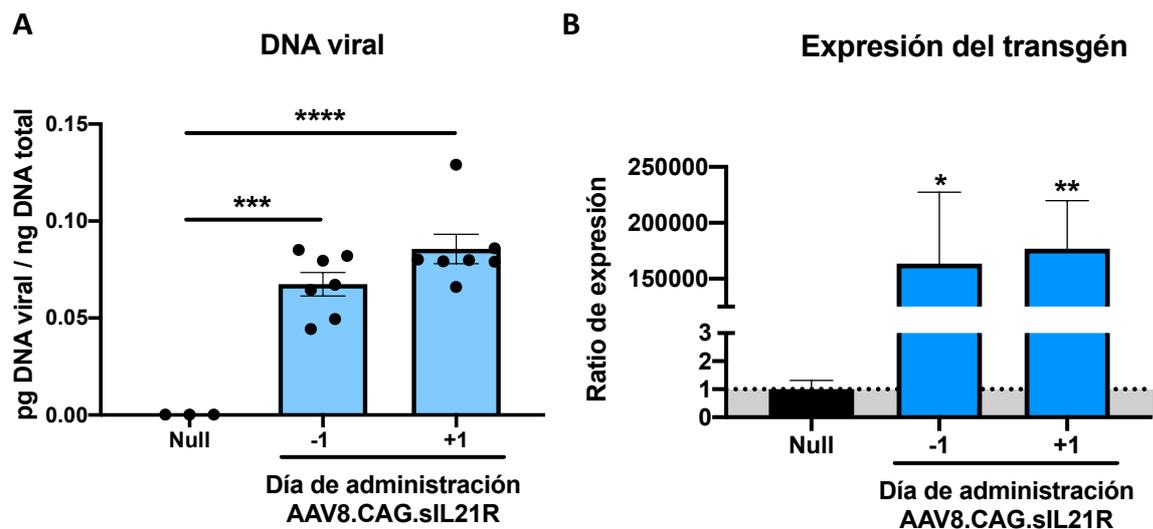


Figura 39.- Cuantificación del DNA viral y expresión hepática del gen terapéutico. Cuantificación por qPCR de la presencia de DNA viral (A) y del transgén (B) en muestras hepáticas. Los datos se representan como la media \pm SEM (A) o como la ratio \pm SEM, normalizados respecto al grupo control null (B). sIL-21R (n=7), null (n=7). * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001), **** (p<0,0001)

1.4.3.- Valoración del efecto clínico de la administración de vectores virales en días cercanos a la inmunización

Curiosamente, al analizar los datos clínicos presentados previamente se pudo apreciar que la severidad de la enfermedad, tanto en el grupo tratado con el vector terapéutico como en el grupo null, parecía hacerse más leve cuando los vectores virales eran administrados a día +1 respecto a cuando eran administrados a día -1, por lo que hipotetizamos que la propia administración de vectores virales producía una alteración en el curso clínico si la administración de éstos se realizaba en días cercanos a la inmunización.

Para validar esta hipótesis se compararon los diferentes grupos null incluidos en el experimento, ya que estos vectores al carecer de expresión de un transgén permiten valorar cual es la alteración de la clínica que se produce únicamente debida a la respuesta inmune contra la cápside del vector. En ese mismo momento, se estaba realizando otro experimento de abordaje preventivo (administración a día -21) que compartió el mismo lote de animales y día de inmunización, con el experimento de aproximación terapéutica temprana. La única diferencia era que en el abordaje preventivo la dosis viral administrada fue de $5 \cdot 10^{11}$ gv/animal. Sin embargo, atendiendo

al apartado 1.3.2 en el que se demostró que el vector null administrado de manera preventiva no altera el desarrollo de la sintomatología en el modelo, se consideró su uso como control comparativo.

Se pudo observar que la incidencia no se alteraba significativamente por el día de administración del vector viral. En el resto de las variables, aunque las diferencias no eran estadísticamente significativas, se apreciaba una tendencia a una clínica menos severa cuando el día de administración era cercano al día de la inmunización de los animales (Tabla 17).

Tabla 17.- Parámetros clínicos de los grupos null

| Grupo experimental | Incidencia | Puntuación clínica (AUC) | Puntuación clínica máxima | Variación de peso (AUC) |
|-----------------------|------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Null (día -21) | 7 / 9 (77,78 %) | 38,43 ± 8,24 | 3,00 ± 0,58 | 90,02 ± 41,48 |
| Null (día -1) | 7 / 10 (70,00 %) | 20,04 ± 6,01 | 2,73 ± 0,60 | 155,40 ± 50,84 |
| Null (día +1) | 6 / 9 (66,67 %) | 14,22 ± 5,45 | 1,89 ± 0,56 | 154,10 ± 21,87 |
| p - valor | 0,866 | 0,091 | 0,284 | 0,452 |

Los datos se presentan como la media ± SEM. AUC: área bajo la curva.

Al igual que en los experimentos anteriores, para valorar de forma más clara el efecto sobre la severidad clínica se analizaron los resultados clínicos únicamente de los animales incidentes. En éstos, la severidad clínica era significativamente más leve cuando los vectores eran administrados días cercanos al día de la inmunización, lo cual se correlacionaba con los valores observados para el resto de las variables clínicas, a pesar de que para ellas las diferencias no eran estadísticamente significativas (Tabla 18, Figura 40).

En resumen, estos datos indican que administrar los vectores virales en días cercanos al día de la inmunización podría provocar una desviación de la respuesta inmune hacia la cápside del vector, dado que aún había partículas virales en sangre, lo que probablemente resultaba en una menor respuesta inmune frente al péptido encefalitogénico. Esto implica que para realizar una aproximación terapéutica la

utilización de vectores de expresión constitutiva no es recomendable. Debido a ello se planteó un experimento posterior donde se utilizarían vectores inducibles, los cuales deberían ser administrados previamente a la inmunización e inducir su expresión una vez establecidos los primeros síntomas clínicos de la EAE.

Tabla 18.- Parámetros clínicos de los animales incidentes de los grupos null

| Grupo experimental | Puntuación clínica (AUC) | Puntuación clínica máxima | Día de inicio | Variación de peso (AUC) |
|--------------------|--------------------------|---------------------------|---------------|-------------------------|
| Null (día -21) | 49,41 ± 5,10 | 3,86 ± 0,14 | 13,57 ± 1,23 | 64,05 ± 45,22 |
| Null (día -1) | 28,63 ± 6,03 | 3,89 ± 0,15 | 19,43 ± 2,03 | 90,58 ± 46,55 |
| Null (día +1) | 21,33 ± 6,41 | 3,00 ± 0,45 | 18,83 ± 2,48 | 142,10 ± 32,37 |
| p - valor | 0,012 | 0,090 | 0,084 | 0,457 |

Los datos se presentan como la media ± SEM. AUC: área bajo la curva.

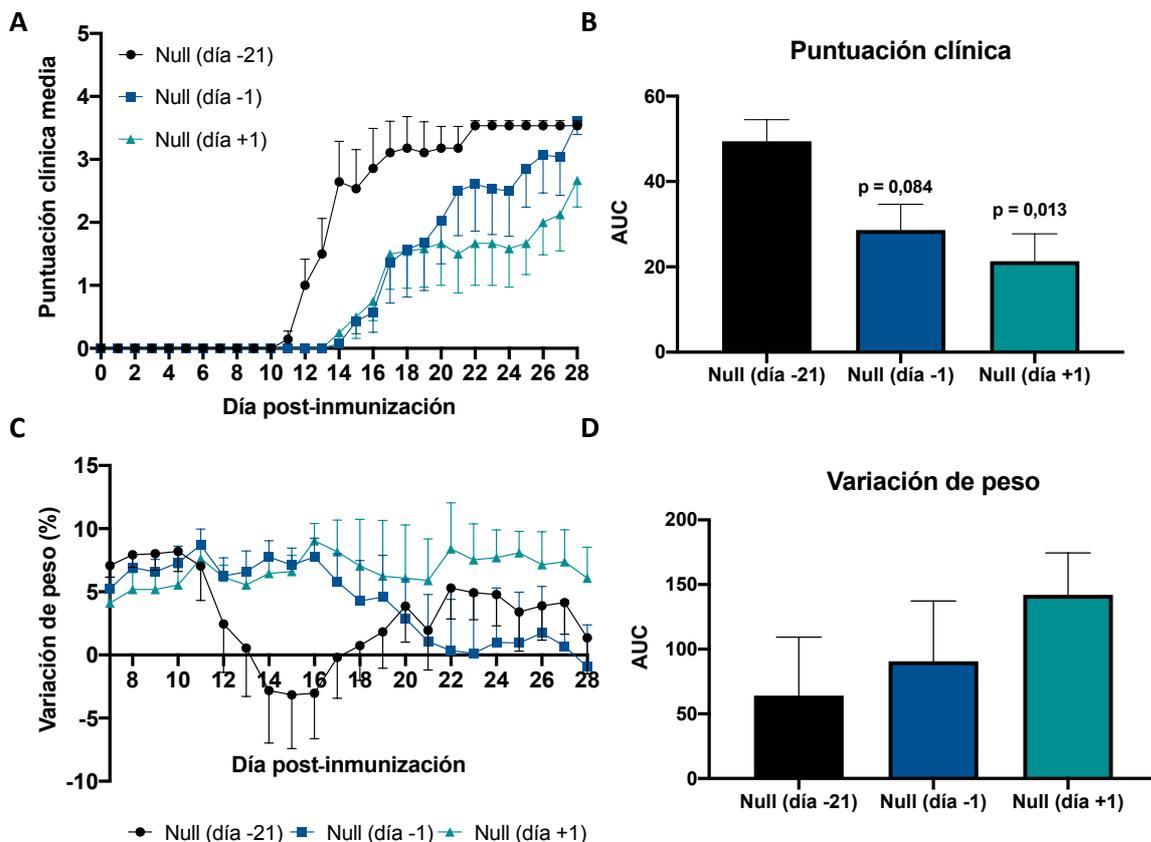


Figura 40.- Resultados clínicos de los animales incidentes de los grupos tratados con el vector null. Seguimiento de la evolución clínica (A) y la variación porcentual del peso (C). Las gráficas (B) y (D) reflejan el AUC de sus respectivas variables clínicas. Null día -21 (n=7), null día -1 (n=7), null día +1 (n=6). Los datos se representan como la media ± SEM.

Capítulo 2

Terapia anti-inflamatoria mediante vectores virales codificantes de la IL-37 humana

2.1.- Generación de los vectores virales portadores de la IL-37

En esta tesis se ha estudiado la eficacia terapéutica tanto de la pre-proteína como de la forma madura de la citoquina, esta última bajo el control de los promotores CMV y CAG. Ambos constructos se diseñaron con dianas de restricción flanqueantes para NheI y NotI y poder así realizar los posteriores clonajes para la generación de los vectores virales que fueron testados en el modelo murino de EAE (Figura 41).

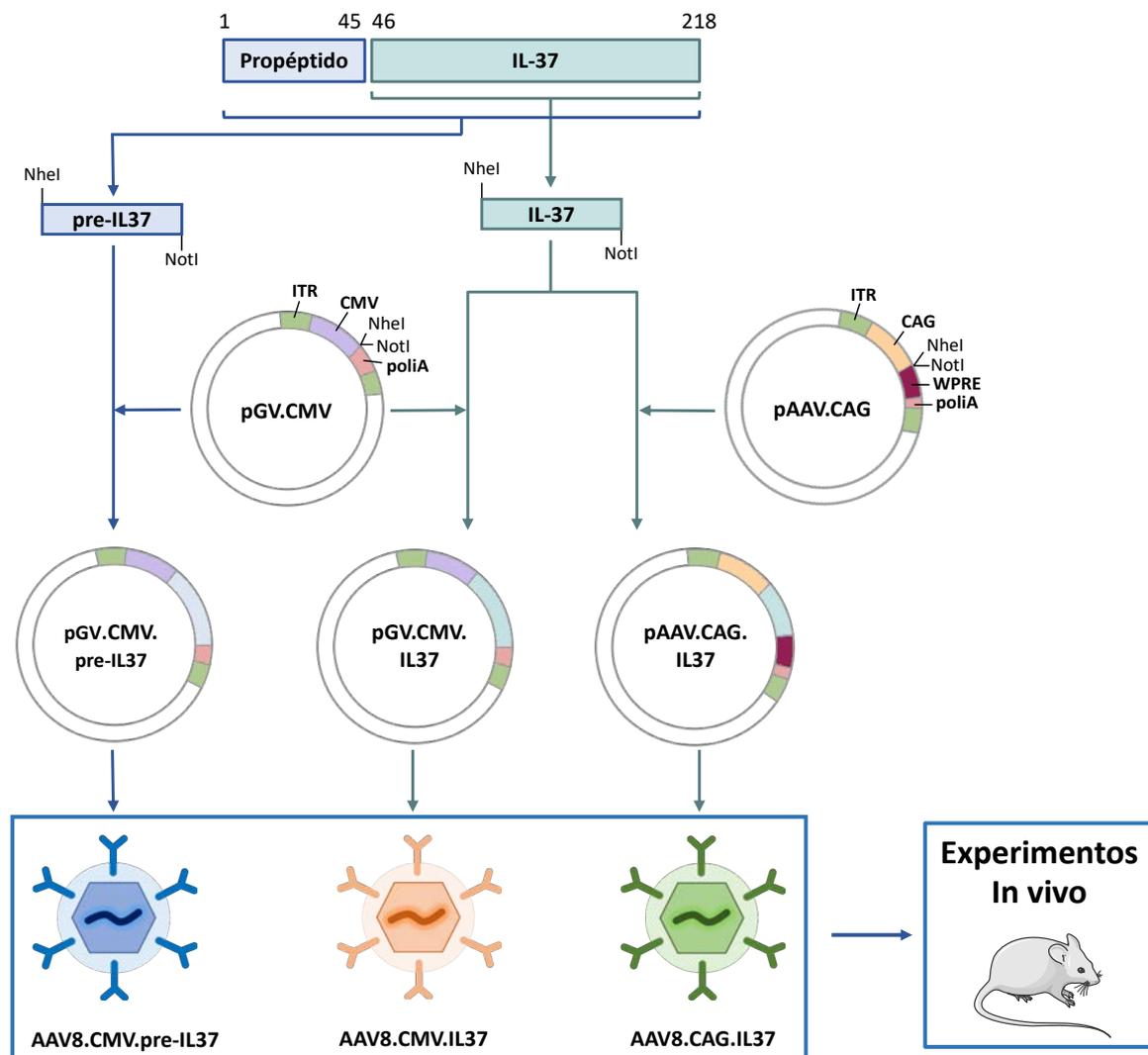


Figura 41.- Estrategia de clonaje para la generación de vectores virales portadores de la IL-37.

2.2.- Estudio del potencial terapéutico del AAV8.CMV.pre-IL37 y AAV8.CMV.IL37 en el modelo murino de EAE

Inicialmente, se decidió testar la eficacia terapéutica de la IL-37 en su forma de pre-proteína, bajo el control de expresión del promotor CMV, de forma similar al ratón transgénico de la citoquina (IL-37tg) (Nold et al., 2010). Al realizar una aproximación preventiva hipotetizamos que cuando se indujese la enfermedad, con el consiguiente inicio del proceso inflamatorio, se produciría una generación natural de la forma madura de la proteína. Para ello se llevó a cabo el mismo diseño experimental que en el abordaje preventivo con sIL-21R (capítulo 1, apartado 1.3.1). A los ratones se les administró una dosis viral de $5 \cdot 10^{11}$ gv/animal de AAV8.CMV.pre-IL37, 21 días antes de la inmunización con MOG₄₀₋₅₅. Como se muestra en la tabla 19, no se detectaron diferencias en ninguna de las variables clínicas analizadas entre el grupo tratado con el vector terapéutico y el grupo control (Figura 42A y 42B).

A la vista de los resultados obtenidos, se decidió comprobar directamente la eficacia anti-inflamatoria de la forma madura de la proteína. En un nuevo experimento, se administró una dosis de $5 \cdot 10^{11}$ gv/animal del AAV8.CMV.IL37, tres semanas antes de la inmunización. Con esta estrategia terapéutica tampoco se observaron diferencias significativas entre el grupo terapéutico y el grupo control (Tabla 19). Sin embargo, pudo observarse que a partir del pico de la enfermedad las curvas de ambos grupos se separaban. Al realizar un análisis estadístico comparativo diario, se observó que en los últimos días del experimento el grupo tratado con IL-37 presentaba una leve mejoría clínica (Figura 42C y 42D).

En ambos experimentos se valoró la expresión hepática de los transgenes, observándose que los vectores eran infectivos y se expresaban de manera eficiente. De esta manera se descartó que los resultados obtenidos fuesen debidos a problemas de expresión de los vectores virales administrados (datos no mostrados).

Tabla 19.- Parámetros clínicos del tratamiento preventivo con AAV8.CMV.pre-IL37 y AAV8.CMV.IL37

| Grupo experimental | Incidencia | Puntuación clínica (AUC) | Puntuación clínica máxima | Variación de peso (AUC) |
|--------------------|-----------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Null | 9 / 9 (100 %) | 57,94 ± 2,34 | 4,00 ± 0,14 | -15,95 ± 38,38 |
| pre-IL37 | 14 / 14 (100 %) | 52,86 ± 3,16 | 3,93 ± 0,15 | 12,96 ± 44,12 |
| p - valor | 1,000 | 0,566 | 0,991 | 0,653 |
| Null | 10 / 10 (100 %) | 59,16 ± 4,42 | 4,65 ± 0,24 | -159,60 ± 45,28 |
| IL-37 | 10 / 10 (100 %) | 55,34 ± 2,22 | 4,10 ± 0,15 | -150,10 ± 29,59 |
| p - valor | 1,000 | 0,698 | 0,136 | 0,862 |

Los datos se presentan como la media ± SEM. AUC: área bajo la curva.

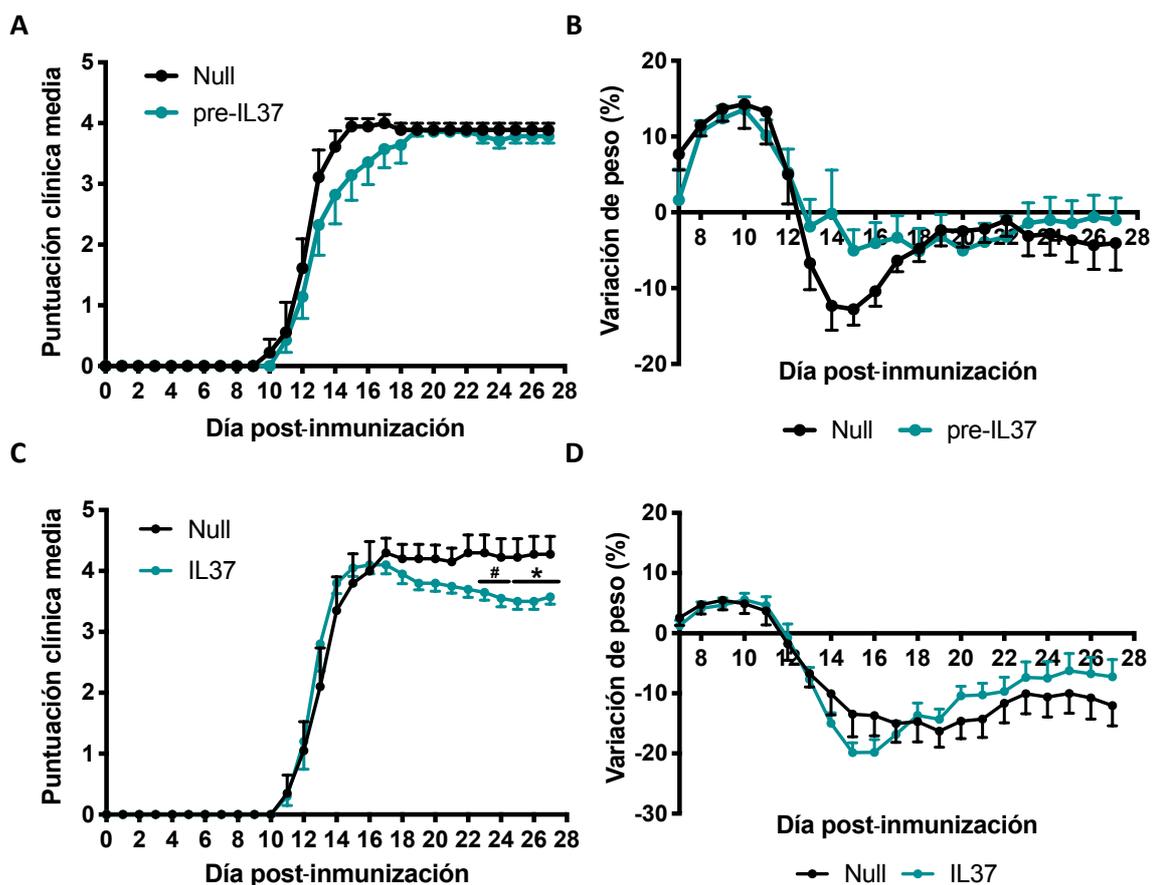


Figura 42.- Resultados clínicos del tratamiento preventivo con AAV8.CMV.pre-IL37 y AAV8.CMV.IL37. Los gráficos (A) y (B) representan el seguimiento clínico y la variación porcentual del peso del grupo pre-IL37 (n=14) y su respectivo grupo control null (n=9). Los gráficos (C) y (D) representan el seguimiento clínico y la variación porcentual del peso del grupo IL-37 (n=10) y su respectivo grupo control null (n=10). Los datos se representan como la media ± SEM. # (p<0,06), * (p<0,05)

2.3.- Estudio del potencial terapéutico del tratamiento preventivo con AAV8.CAG.IL37

A la vista de los resultados obtenidos hasta ese momento, hipotetizamos que la ausencia de diferencias clínicas podía deberse a que no se estaban produciendo los niveles suficientes de la citoquina como para apreciar un efecto clínico en los animales tratados. Por ello se decidió realizar un nuevo experimento preventivo manteniendo la dosis viral y el día de administración pero clonando la forma activa de la proteína bajo el promotor CAG, el cual ya se ha comentado que permite obtener una mayor expresión hepática del transgén. En este caso, el grupo de animales tratado con AAV8.CAG.IL37 presentaba una tendencia a que un menor número de animales desarrollaran la enfermedad, a pesar de que las diferencias clínicas no llegaban a ser estadísticamente significativas, probablemente debido al pequeño tamaño muestral y la dispersión de los datos. Además, al realizar un análisis estadístico por días se pudo apreciar que el grupo tratado con IL-37 presentaba una fase crónica, a partir del día 21 p.i, significativamente más leve que el grupo control (Tabla 20, Figura 41). Al analizar los parámetros clínicos únicamente de los animales incidentes no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (datos no mostrados).

Tabla 20.- Parámetros clínicos del tratamiento preventivo con AAV8.CAG.IL37

| Grupo experimental | Incidencia | Puntuación clínica (AUC) | Puntuación clínica máxima | Variación de peso (AUC) |
|--------------------|-----------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Null | 7 / 9 (77,78 %) | 38,43 ± 8,24 | 3,00 ± 0,58 | 90,02 ± 41,48 |
| IL-37 | 3 / 8 (37,50 %) | 18,77 ± 9,16 | 1,41 ± 0,69 | 184,30 ± 56,77 |
| p - valor | 0,092 | 0,101 | 0,114 | 0,193 |

Los datos se presentan como la media ± SEM. AUC: área bajo la curva.

Para obtener una mejor potencia estadística en los resultados clínicos obtenidos se debería realizar un nuevo experimento en las mismas condiciones para así aumentar el tamaño muestral de cada uno de los grupos y corroborar los resultados observados, al igual que se hizo con el tratamiento del sIL-21R. Sin embargo, debido a exigencias temporales se decidió darle mayor peso los estudios inmunológicos.

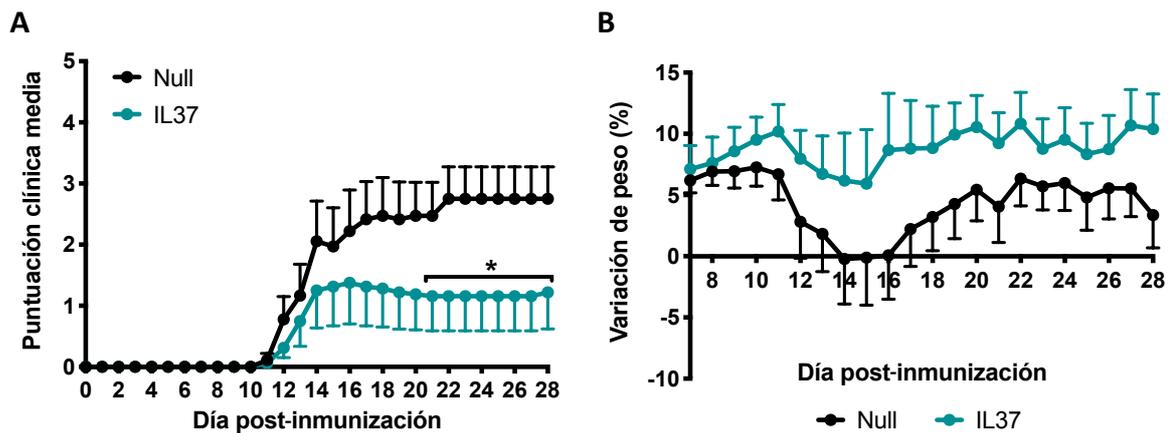


Figura 43.- Resultados clínicos del tratamiento preventivo con AAV8.CAG.IL37. Seguimiento de la evolución clínica (A) y la variación porcentual del peso (B) del grupo IL-37 (n=8) y grupo control null (n=9). Los datos se representan como la media \pm SEM. * ($p < 0,05$)

2.3.1.- Estudio histopatológico del SNC de animales tratados con AAV8.CAG.IL37

Se realizaron marcajes por inmunofluorescencia en la médula espinal para valorar: desmielinización (MBP), activación de microglía (LEA), respuesta astrocitaria (GFAP), daño axonal (SMI-32) e infiltración de células T (CD3).

Como se aprecia en la figura 44, el grupo tratado con IL-37 presentaba una menor activación microglial en el SNC (LEA). Sin embargo, en el resto de los marcajes (MBP, GFAP, SMI-32 y CD3), a pesar de que se apreciaba una tendencia a un mejor estado histopatológico del grupo terapéutico, las diferencias no eran estadísticamente significativas (Tabla 21).

Tabla 21.- Cuantificación de marcajes inmunohistopatológicos

| Grupo | MBP | LEA | GFAP | SMI-32 | CD3 |
|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------------|
| experimental | (% área) | (% área) | (% área) | (% área) | (células/mm ²) |
| Null | 85,43 \pm 2,63 | 6,75 \pm 2,38 | 1,08 \pm 0,43 | 1,89 \pm 0,63 | 392,00 \pm 245,70 |
| IL-37 | 87,68 \pm 3,78 | 3,05 \pm 1,93 | 0,39 \pm 0,07 | 0,79 \pm 0,41 | 228,90 \pm 194,90 |
| p - valor | 0,625 | 0,036 | 0,114 | 0,139 | 0,114 |

Los datos se presentan como la media \pm SEM.

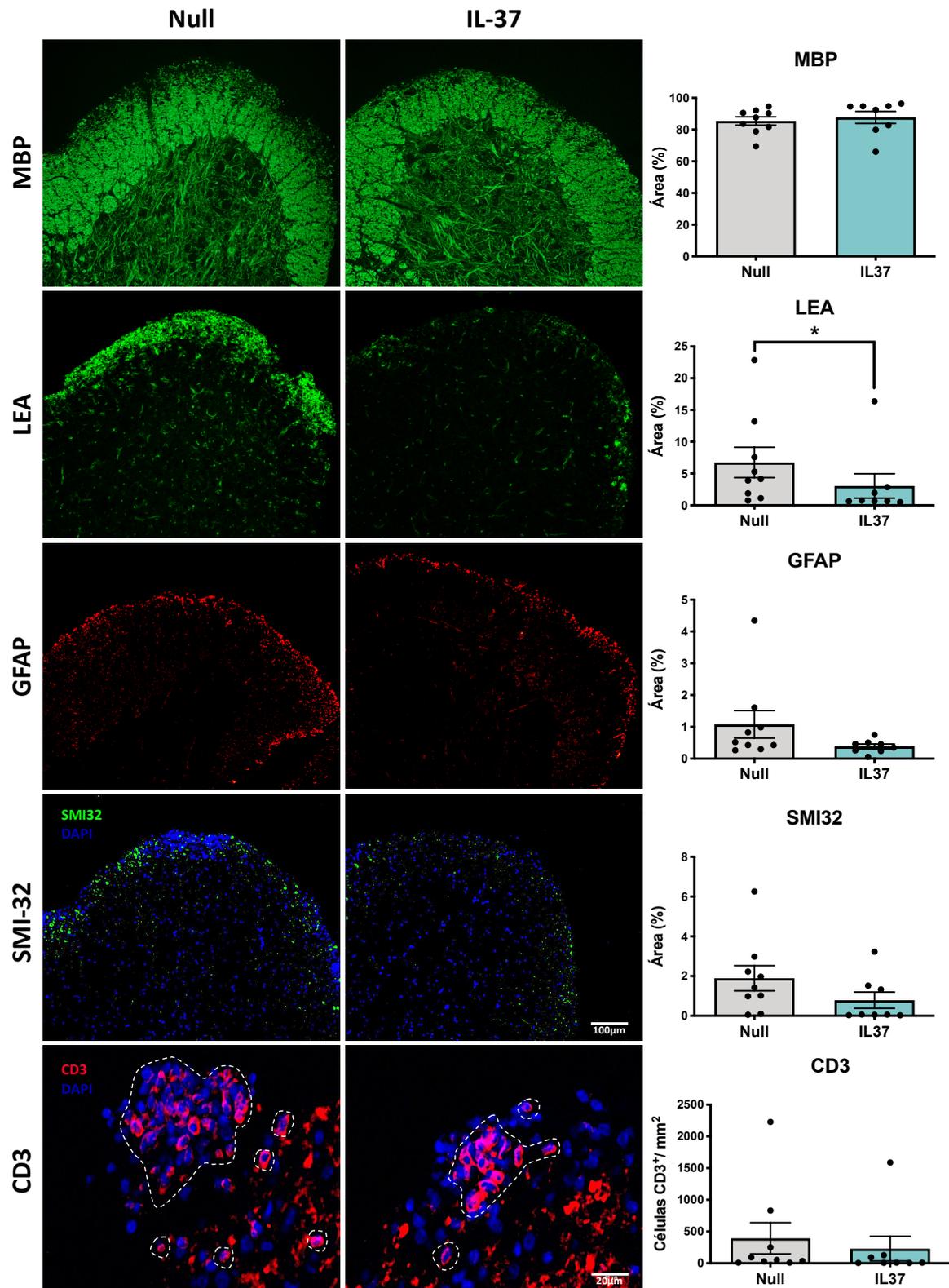


Figura 44.- Estudio histopatológico del tratamiento preventivo con AAV8.CAG.IL37. Cada imagen pertenece a un animal representativo de la media del grupo para ese marcaje. Los marcajes MBP, LEA, GFAP y SMI-32 tienen la misma escala. El marcaje de las células T CD3⁺ se ha delimitado con una línea de puntos. IL-37 (n=8), null (n=9). Los datos se representan como la media ± SEM. * (p<0,05)

2.3.2.- Estudio del perfil inmunológico de los animales tratados con AAV8.CAG.IL37

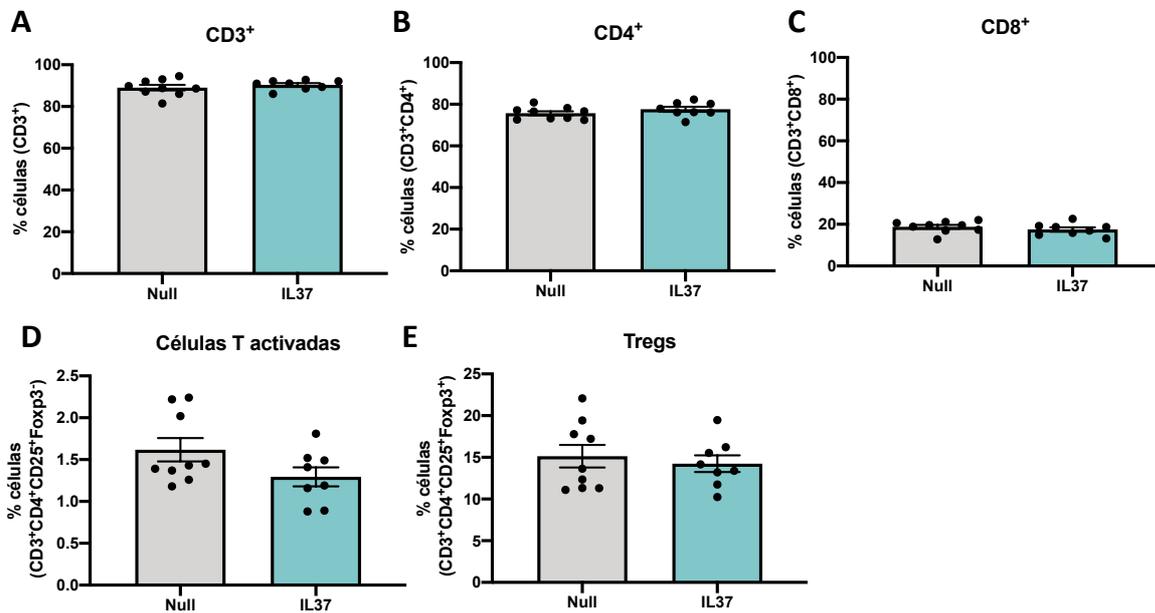
Para analizar el perfil inmunológico de los animales tratados con IL-37, además de las muestras obtenidas del experimento a día 28 p.i (fase crónica), se realizó un nuevo experimento eutanasiando los animales a día 15 p.i (fase aguda). Se analizaron las diferentes poblaciones inmunes por citometría, se realizaron estudios de proliferación de esplenocitos y se estudió el perfil de secreción de citoquinas.

2.3.2.1.- Análisis de poblaciones inmunes y citoquinas por citometría de flujo

En fase crónica (28 p.i), se observó una tendencia a un menor porcentaje de células T CD4⁺ activadas (CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁻) en el grupo tratado con IL-37 (Null: 1,62 ± 0,14; IL-37: 1,29 ± 0,11; p = 0,098). En el resto de poblaciones de linfocitos T analizadas (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ y Tregs) no se observaron diferencias respecto al grupo control. En cuanto a las poblaciones celulares productoras de citoquinas, únicamente se pudo observar una tendencia a un menor porcentaje de células productoras de IL-10 en el grupo terapéutico respecto al grupo control, aunque las diferencias no eran estadísticamente significativas (Null: 4,00 ± 0,51; IL-37: 2,91 ± 0,17; p = 0,072). Para el resto de poblaciones celulares productoras de citoquinas analizadas [IL-17⁺, IFNγ⁺ (CD4⁺), IFNγ⁺ (CD8⁺) e IL-4⁺] no se apreciaron diferencias entre el grupo tratado en el vector terapéutico y el grupo control (Figura 45).

En la fase aguda (día 15 p.i), el grupo tratado con IL-37 presentaba un mayor porcentaje de células T totales (CD3⁺), probablemente debido al aumento observado en las células T CD8⁺. Sin embargo, presentaba un menor porcentaje de células T CD4⁺ activadas y Tregs. Respecto a las poblaciones celulares productoras de citoquinas se pudo observar una disminución del porcentaje de células IL-17⁺, IFNγ⁺ (CD4⁺), IFNγ⁺ (CD8⁺) e IL-10⁺ respecto al grupo null (Tabla 22, Figura 46).

Células T (Fase crónica)



Citoquinas (Fase crónica)

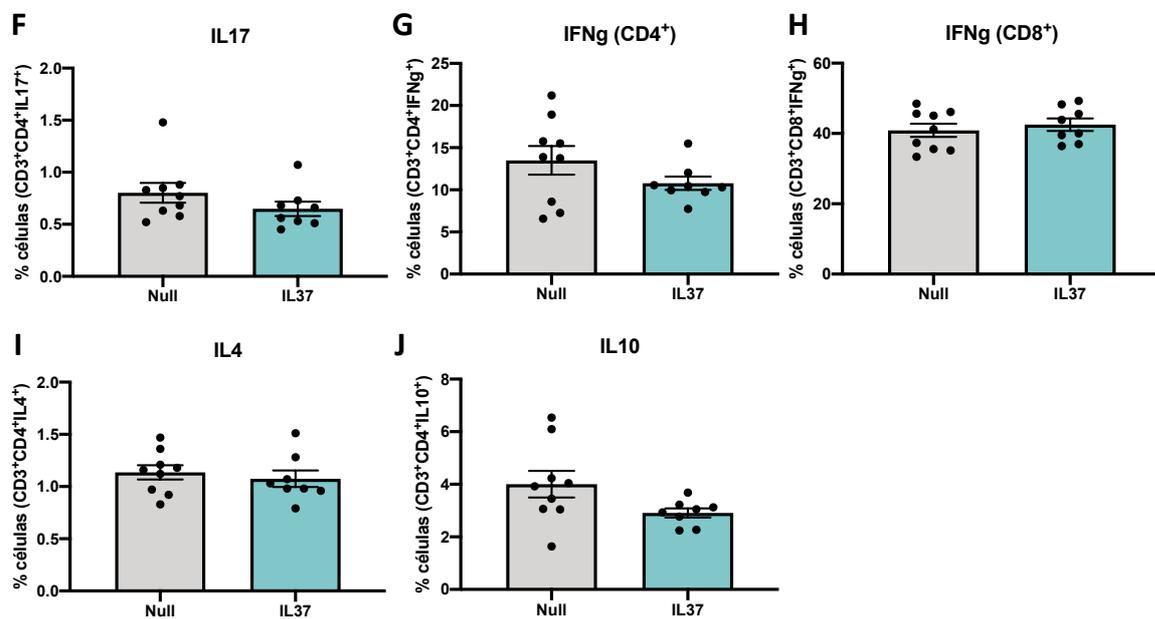
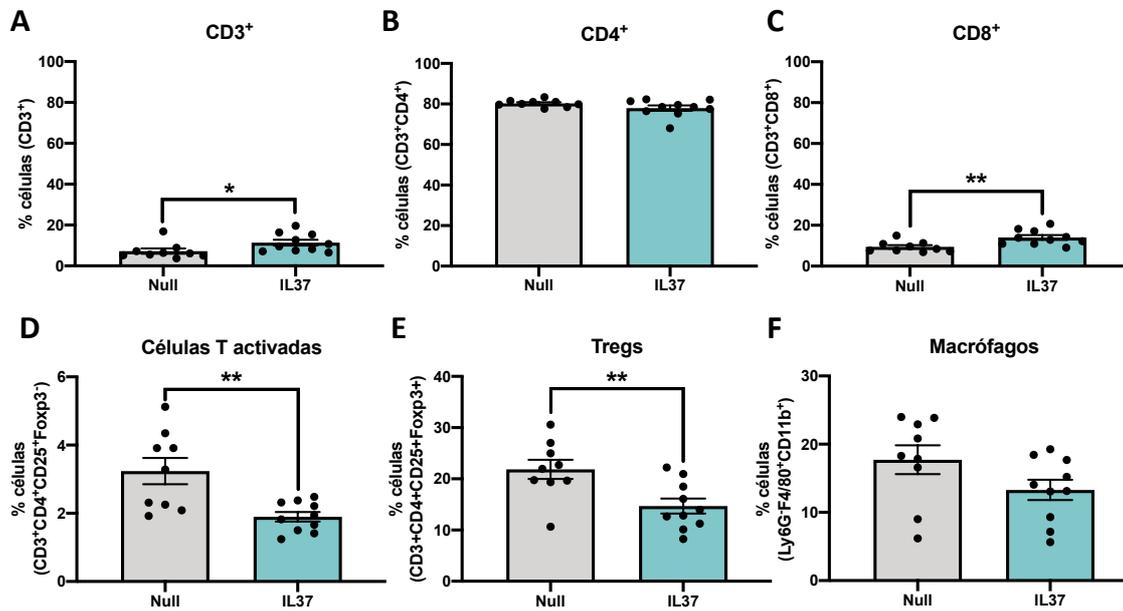


Figura 45.- Porcentaje de células T (A-E) y células T productoras de diversas citoquinas (F-J) en esplenocitos durante la fase crónica en animales tratados con AAV8.CAG.IL37. IL-37 (n=8), null (n=9). Los datos se representan como la media ± SEM.

Células T y macrófagos (Fase aguda)



Citoquinas (Fase aguda)

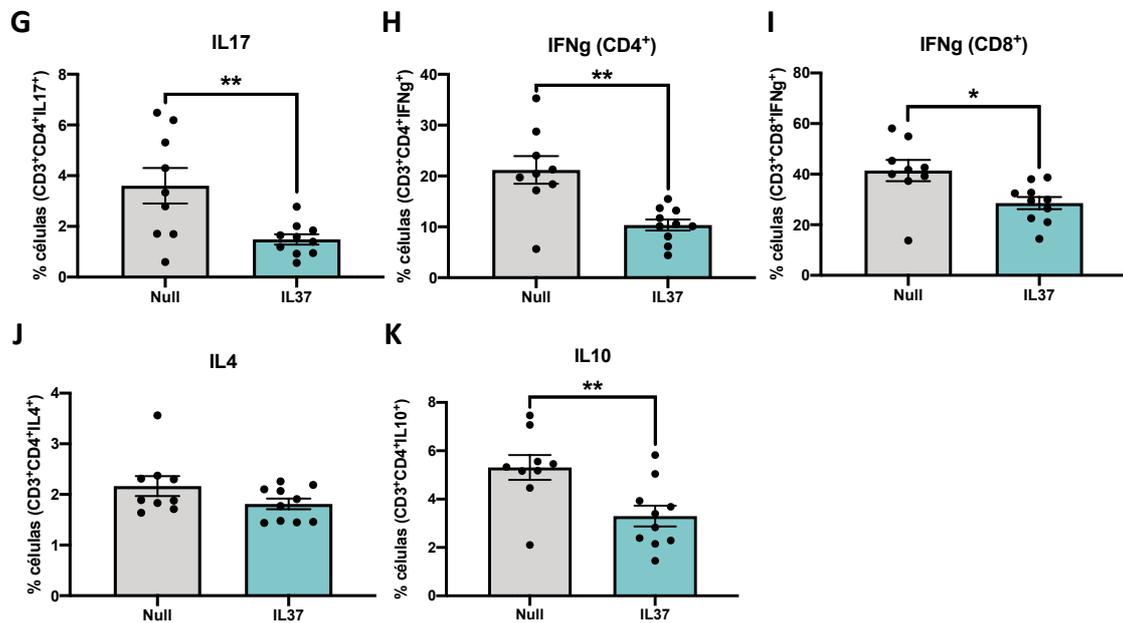


Figura 46.- Porcentaje de células T (A-E), macrófagos (F) y células T productoras de diversas citoquinas (G-K) en esplenocitos durante la fase aguda en animales tratados con AAV8.CAG.IL37. IL-37 (n=10), null (n=9). Los datos se representan como la media \pm SEM. * (p<0,05), ** (p<0,01).

Tabla 22.- Diferencias en el porcentaje de poblaciones de células T y citoquinas en fase aguda

| | % CD3 ⁺ | % CD8 ⁺ | % Células T activadas | % Tregs |
|------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|--------------|
| Null | 7,22 ± 1,30 | 9,42 ± 0,87 | 3,24 ± 1,15 | 21,85 ± 1,88 |
| IL-37 | 11,37 ± 1,42 | 14,03 ± 3,65 | 1,90 ± 0,14 | 14,68 ± 1,47 |
| p - valor | 0,047 | 0,006 | 0,003 | 0,007 |

| | % IL-17 ⁺ | % IFNγ ⁺ (CD4 ⁺) | % IFNγ ⁺ (CD4 ⁺) | % IL-10 ⁺ |
|------------------|----------------------|---|---|----------------------|
| Null | 3,60 ± 0,70 | 21,19 ± 2,72 | 41,46 ± 4,20 | 5,31 ± 0,51 |
| IL-37 | 1,49 ± 0,20 | 10,35 ± 1,08 | 28,57 ± 2,41 | 3,30 ± 0,43 |
| p - valor | 0,007 | 0,001 | 0,014 | 0,008 |

Los datos se presentan como la media ± SEM.

Respecto a las poblaciones de células mieloides totales se observó que el grupo tratado con AAV8.CAG.IL37 presentaba un menor porcentaje de estas células (Null: 75,97 ± 3,47; IL-37: 63,14 ± 3,57; p = 0,020) respecto al grupo control. Al analizar las poblaciones de DCs, no se observaron diferencias en cuanto al porcentaje de DCs totales (DCs mieloides + DCs linfoides) ni de DCs mieloides. Sin embargo, el grupo tratado con el vector terapéutico presentaba un menor porcentaje de DCs totales activadas: células MHCII⁺ (Null: 96,84 ± 0,40; IL-37: 95,62 ± 0,34; p = 0,031) y células CD80⁺ (Null: 83,64 ± 1,05; IL-37: 79,00 ± 1,18; p = 0,009), además estas células también mostraron un descenso de la MFI para el marcaje de CD80⁺ (Null: 5626,00 ± 234,50; IL-37: 5052,00 ± 129,30; p = 0,041). De igual forma, se observó un menor porcentaje de DCs mieloides activadas: células MHCII⁺ (Null: 96,13 ± 0,48; IL-37: 94,46 ± 0,38; p = 0,0132) y células CD80⁺ (Null: 86,87 ± 0,85; IL-37: 81,32 ± 1,02; p = 0,001).

Por otro lado, el grupo terapéutico presentaba un mayor porcentaje de DCs linfoides (Null: 0,49 ± 0,04; IL-37: 0,76 ± 0,06; p = 0,002). Sin embargo, Para esta población no se observaron diferencias en cuanto al porcentaje de células activadas (porcentaje de células MHCII⁺ y CD80⁺) ni al estado de activación de las mismas (MFI de MHCII⁺ y CD80⁺) (Figura 47).

Células dendríticas (Fase aguda)

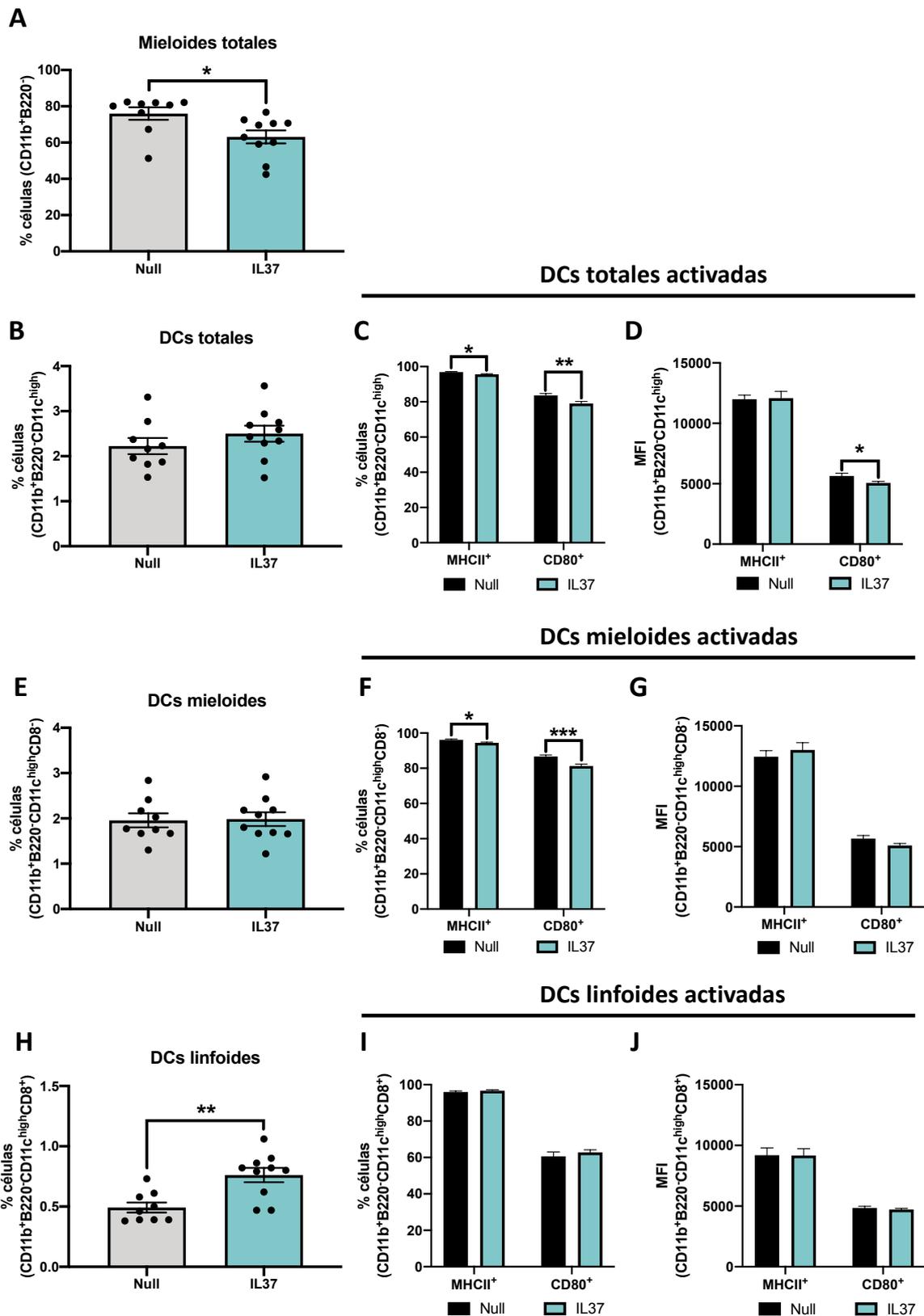


Figura 47.- Porcentaje de células mieloides totales (A), DCs (B,E,H) y activación de DCs (C,D,F,G,I,J) en esplenocitos durante la fase aguda en animales tratados con AAV8.CAG.IL37. IL-37 (n=10), null (n=9). Los datos se representan como la media ± SEM. * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001)

2.3.2.2.- Estudio de la respuesta proliferativa de esplenocitos

En fase aguda (Figura 48A), los esplenocitos de los animales tratados con IL-37 presentaban una marcada tendencia a una mayor respuesta policlonal (PHA) (Null: $13,34 \pm 1,23$; IL-37: $18,48 \pm 2,20$; $p = 0,058$), lo cual se podía relacionar con el incremento significativo del porcentaje de células T CD3⁺ y T CD8⁺ observado por citometría. Sin embargo, no se observaron diferencias en la proliferación antígeno-específica (MOG₄₀₋₅₅) (Null: $7,75 \pm 1,11$; IL-37: $5,63 \pm 0,80$; $p = 0,133$). En fase crónica (Figura 48B), no se apreciaron diferencias ni en la respuesta frente a PHA (Null: $39,22 \pm 4,09$; IL-37: $47,51 \pm 5,26$; $p = 0,227$) ni en la proliferación frente a MOG₄₀₋₅₅ (Null: $8,66 \pm 1,20$; IL-37: $10,26 \pm 1,93$; $p = 0,480$).

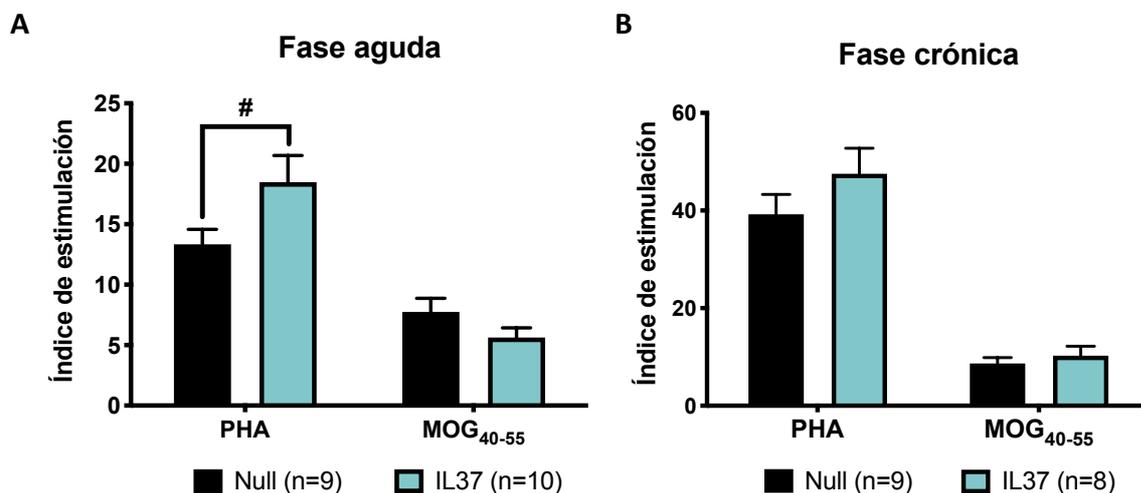


Figura 48.- Respuesta proliferativa inespecífica (PHA) y antígeno-específica (MOG₄₀₋₅₅) de esplenocitos en la fase aguda (A) y la fase crónica (B) de animales tratados con AAV8.CAG.IL37. Los datos se representan como la media \pm SEM. # ($p < 0,06$)

2.3.2.3.- Análisis del perfil de secreción de citoquinas en el SN del cultivo de esplenocitos

Se cuantificaron las concentraciones de diferentes citoquinas en los SN de los esplenocitos estimulados con MOG₄₀₋₅₅. Se cuantificaron un total de 18 citoquinas características de las poblaciones Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 y Treg. Ninguna de las siguientes citoquinas pudo ser valorada debido a que la mayoría de las muestras analizadas se encontraron por debajo del límite de detección: TGF β 1, IL-12p70, IL-5, IL-23, IL-27 e IL-9.

En fase aguda, el grupo tratado con IL-37 presentaba una menor concentración de IL-4 respecto al grupo control (Null: $32,08 \pm 7,22$; IL37: $9,57 \pm 2,23$; $p = 0,006$). En el resto de citoquinas estudiadas en fase aguda no se encontraron diferencias significativas, al igual que en los análisis realizados en la fase crónica (Figura 49).

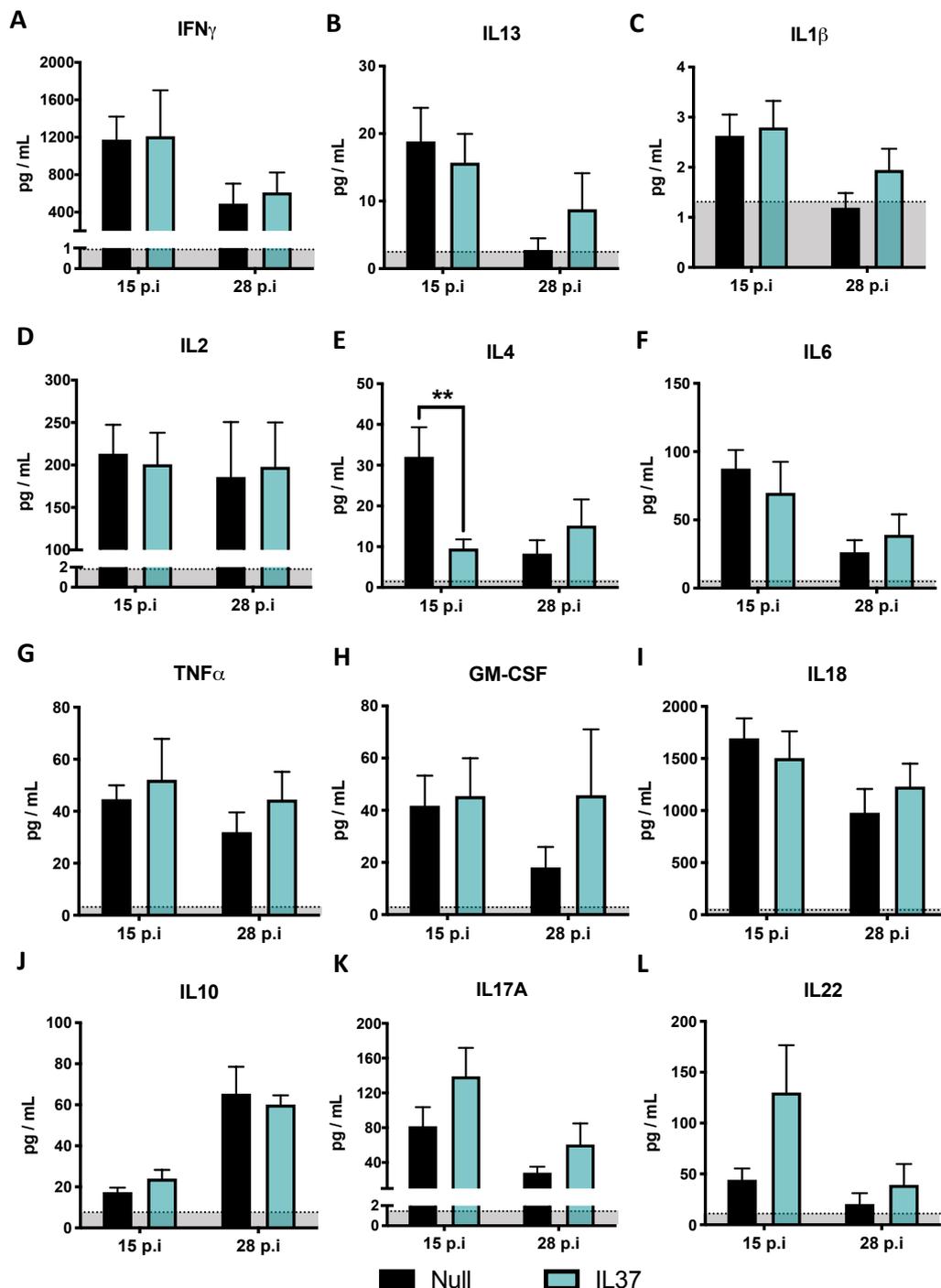


Figura 49.- Concentración de citoquinas detectadas en el SN de esplenocitos estimulados con MOG₄₀₋₅₅ de animales tratados con AAV8.CAG.IL37. Fase aguda (15 p.i.): IL-37 (n=10), null (n=9). Fase crónica (27 p.i.): IL-37 (n=8), null (n=9). Las zonas sombreadas indican el límite de detección para cada citoquina. Los datos se representan como la media \pm SEM. ** ($p < 0,01$).

Capítulo 3

Desarrollo de la aplicación de vectores inducibles para el tratamiento terapéutico de la EAE

3.1.- Diseño y generación de los vectores inducibles portadores de las moléculas terapéuticas

Los resultados obtenidos al final del capítulo 1 indicaron que la realización de una aproximación terapéutica con vectores virales de expresión constitutiva en el modelo de EAE no era lo más adecuado debido a que probablemente se produzca una desviación de la respuesta inmune hacia la cápside del vector, haciendo que la respuesta generada frente a la MOG₄₀₋₅₅ se viese disminuida y con ello la severidad de la clínica. Por esta razón se decidió desarrollar unos vectores de terapia génica con un casete de expresión inducible, el cual permitió por una parte administrar los vectores previamente a la inmunización y, por otra, que la expresión del gen terapéutico fuese inducida en el momento deseado, que en este caso era en el momento en el que aparecieron los primeros síntomas de la enfermedad. De esta manera se pudo realizar una aproximación terapéutica sin producir una alteración de la respuesta inmune asociada a la administración de cápsides virales.

Existen diferentes sistemas inducibles siendo el regulado por tetraciclinas el más utilizado en mamíferos. De las variantes existentes, el que más se adecuaba a nuestras necesidades experimentales era el denominado sistema TetOn inducible por doxiciclina (Dox), el cual consta de dos elementos principales: el gen codificante del transactivador y el operón Tet integrado en un promotor mínimo constituyendo así un promotor inducible (P_{TetOn}). El funcionamiento molecular del sistema inducible se basa en un bloqueo de la transcripción del gen de interés en ausencia de Dox, mientras que, en presencia de Dox, ésta se acopla al transactivador produciendo un cambio de conformación proteica que le permite unirse al promotor inducible y que se produzca la transcripción del gen de interés permitiendo la traducción de la proteína terapéutica (Figura 50).

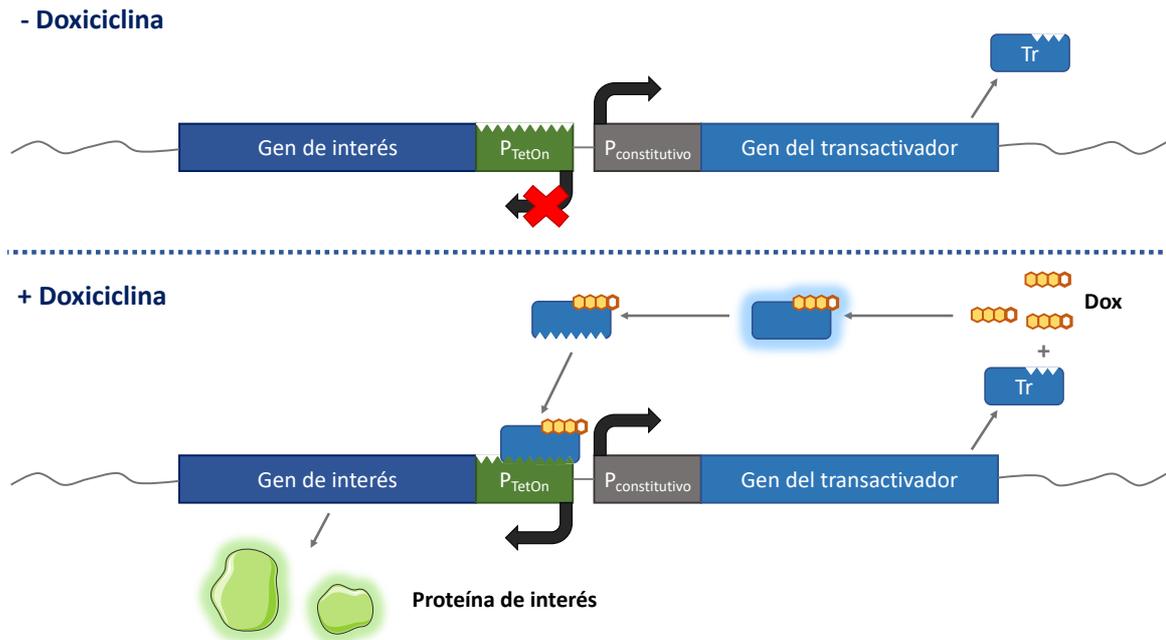


Figura 50.- Funcionamiento del sistema inducible por Dox (TetOn). En ausencia de Dox el transactivador (Tr) es incapaz de unirse al promotor inducible y activar la transcripción del gen de interés. Sin embargo, en presencia de Dox, se produce un cambio de conformación del Tr que le permite unirse al promotor y activar así la expresión del gen de interés y la producción de la proteína terapéutica.

La secuencia de nucleótidos del sistema inducible se encargó sintetizar a la empresa Eurofins, con dianas de restricción flanqueantes para las enzimas AvrII y NotI, lo cual permitiría su posterior clonaje. El sistema inducible sintético consistía en el promotor constitutivo (fosfoglicerato quinasa 1 humano), el gen del transactivador, con su respectiva poliA, y el promotor inducible TetOn, que se trataba de un híbrido entre el operón Tet y el promotor CMV mínimo. Posteriormente el sistema inducible fue clonado en un plásmido intermedio que contenía las ITRs necesarias para la generación de los AAVs. Los genes de las moléculas terapéuticas (siL-21R e IL-37) fueron clonados entre los sitios NheI y NotI presentes en el sitio de clonaje múltiple (MCS) diseñado. Una vez obtenidos los constructos finales se procedió a producir los diferentes vectores AAV8.TetOn (Figura 51). Esta misma estrategia se siguió para clonar el gen codificante de la eGFP, el cual sirvió para verificar la correcta expresión del transgén al ser inducido por Dox tanto en líneas celulares como *in vivo*.

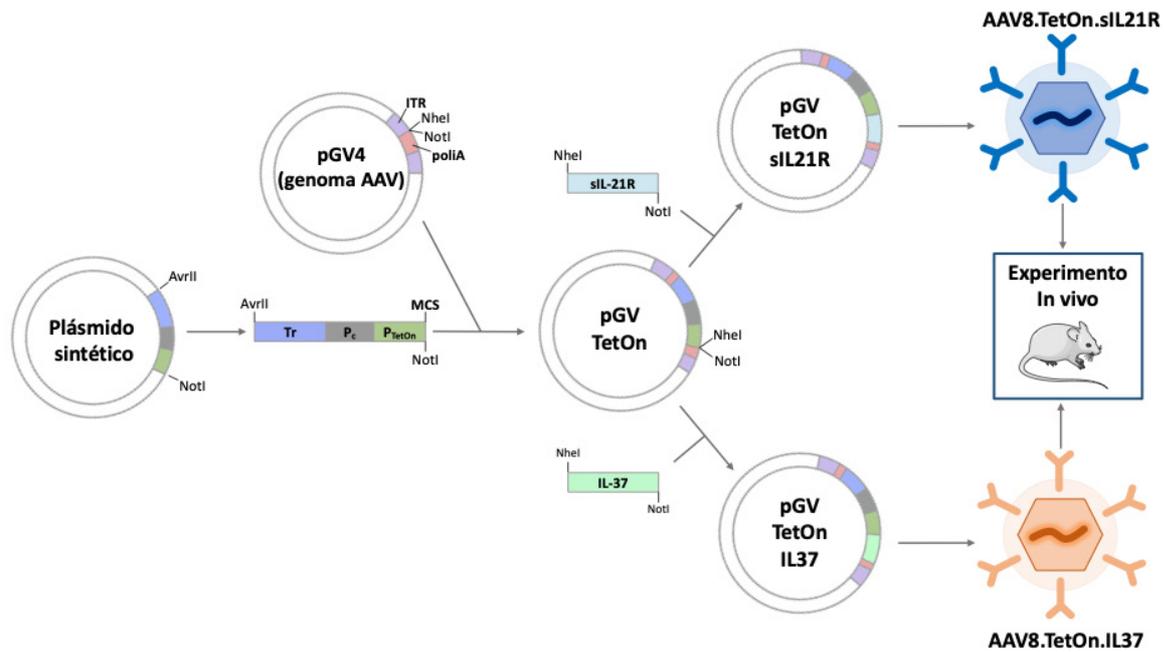


Figura 51.- Estrategia de clonaje para la generación de vectores virales inducibles portadores del sIL-21R e IL-37. Tr: transactivador, P_c: promotor constitutivo, MCS: sitio de clonaje múltiple.

3.2.- Validación *in vitro* del sistema inducible

Previamente a la administración de los vectores inducibles en animales, se verificó que los constructos diseñados funcionaban *in vitro*, cuán sensible era el sistema a la inducción con Dox y cuál era la expresión basal cuando no se añadía inductor. Para ello, se transfectaron células HEK293 con los plásmidos inducibles de las moléculas terapéuticas (pGV.TetOn.sIL21R y pGV.TetOn.IL37) y de la eGFP (pGV.TetOn.eGFP). A las 3 h post-transfección se realizó un cambio de medio y se añadieron diferentes concentraciones de Dox. En el caso de la eGFP se valoró su expresión por fluorescencia a las 24 y 48 h, mientras que en el caso de las moléculas terapéuticas se realizó una extracción proteica a las 48 h post-inducción y se valoró su expresión mediante *Western-Blot*.

Como se puede observar en la figura 52A, el sistema era altamente sensible y rápido, ya que en el caso de la eGFP podía detectarse su expresión tras solo 24 h, incluso a concentraciones muy bajas del inductor. En la condición de ausencia de Dox se podía apreciar cierta expresión basal; sin embargo, ésta era prácticamente imperceptible por lo que no hubo ningún inconveniente para validar el sistema. También se corroboró que

tanto la expresión del sIL-21R como de la IL-37 se producía de manera proporcional a la concentración de Dox añadida (Figura 52B y 52C).

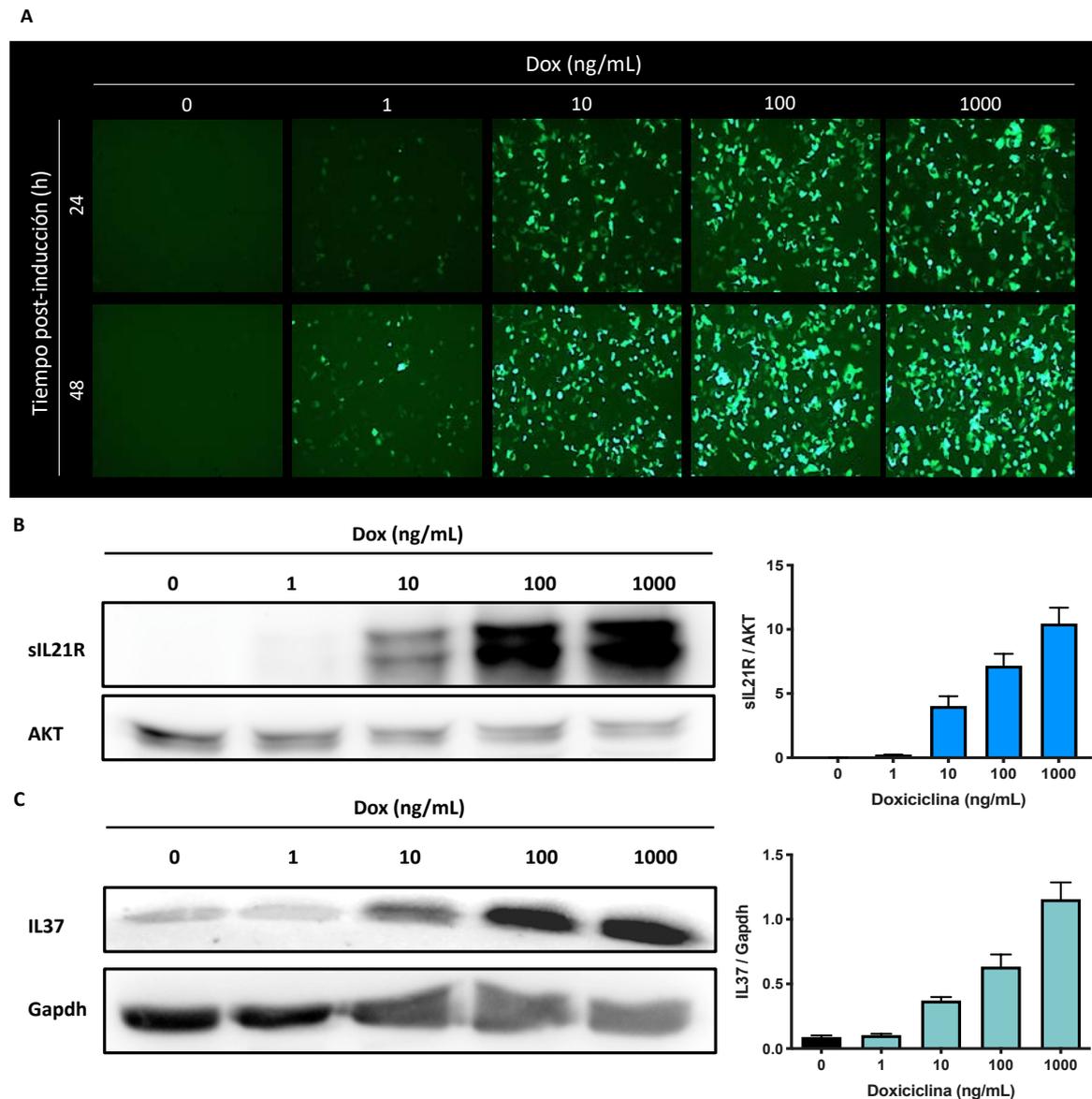


Figura 52.- Expresión de los diferentes genes clonados en el sistema TetOn mediante transfección en células HEK293. La figura (A) corresponde a la detección por fluorescencia verde de la expresión de eGFP a las 24 y 48 h post-transfección. Los gráficos (B) y (C) corresponden a la inmunodetección tras 48 h del sIL-21R y de la IL-37 respectivamente. En ambos casos se muestran inmunodetecciones pertenecientes a uno de los dos experimentos independientes realizados. Los datos se representan como la media \pm SEM.

Una vez generados los vectores virales portadores de las moléculas terapéuticas se comprobó su infectividad y su expresión realizando una infección de 20.000 gv/célula en la línea HEK293. A las 24 h post-infección se añadió una concentración de 1 μ g/mL de Dox al medio y se extrajo el RNA 48 h después para valorar la expresión de los

transgenes mediante PCR convencional. En la figura 53 se muestra que los vectores virales generados eran infectivos y respondían a la presencia del inductor.

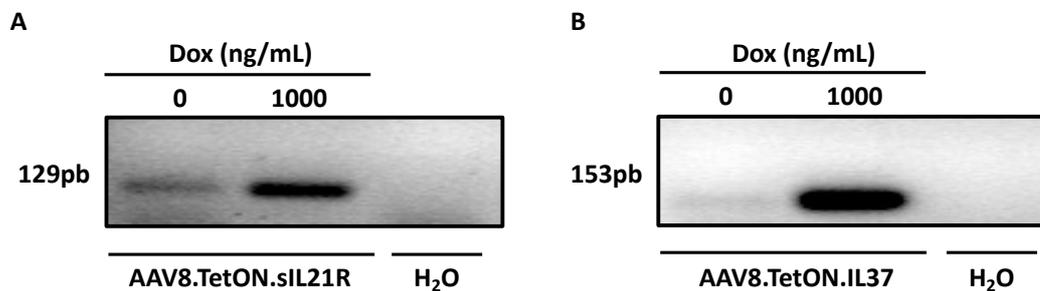


Figura 53.- Detección por PCR de la expresión del sIL-21R (A) y de la IL-37 (B) en células infectadas con los vectores inducibles.

3.3.- Puesta a punto del sistema de inducción *in vivo*

Antes de realizar el experimento *in vivo* con las moléculas terapéuticas se decidió llevar a cabo una prueba previa administrando el vector AAV8.TetOn.eGFP para conocer la dosis de Dox que permitía una óptima expresión del gen terapéutico. Por cuestiones temporales y del número de animales disponibles ($n=7$) solo se pudo realizar una prueba piloto en la cual a cada ratón se le adjudicó una condición experimental.

Por una parte, para asegurar una correcta infección hepática de los AAVs y, por otra, administrar la menor dosis posible del inductor, además de la dosis viral administrada en las aproximaciones preventivas ($5 \cdot 10^{11}$ gv/animal), se decidió administrar también el doble de dosis viral (10^{12} gv/animal). Atendiendo a la bibliografía disponible, se decidió probar dos dosis diferentes de Dox, 5 mg/kg y 25 mg/kg, administrada diariamente durante 4 días vía i.p. La eGFP al tratarse de una proteína fluorescente intracelular permitió valorar su expresión hepática mediante citometría de flujo y el análisis de dos parámetros: el porcentaje de células positivas y la MFI.

Primero se comprobó la expresión basal de las diferentes dosis virales en ausencia de inductor. Para ello se utilizaron los valores de un animal al cual no se le administró ni vector ni inductor. Como se observa en la figura 54, la expresión basal es mínima independientemente de la dosis viral administrada. Respecto a los animales tratados con Dox se observó un incremento gradual de la expresión hepática de eGFP obteniendo la

máxima expresión en el animal administrado con una dosis viral de 10^{12} gv y 25 mg/kg de Dox. Durante el experimento se monitorizó la variación de peso de los animales, dado que era un parámetro por el cual se podía valorar la posible toxicidad de de la Dox. Para la condición mencionada no se observó un cambio de peso que implicase una toxicidad apreciable por la administración del inductor (datos no mostrados), por lo que dicha condición fue la seleccionada para llevar a cabo el experimento con los constructos terapéuticos.

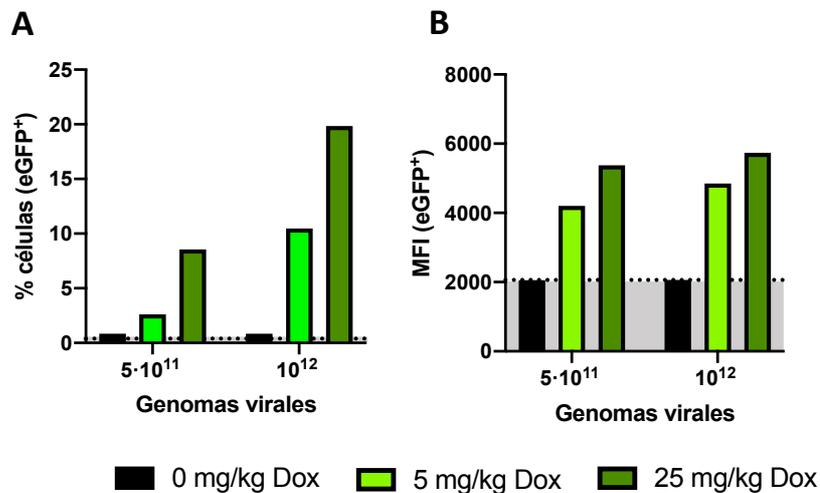
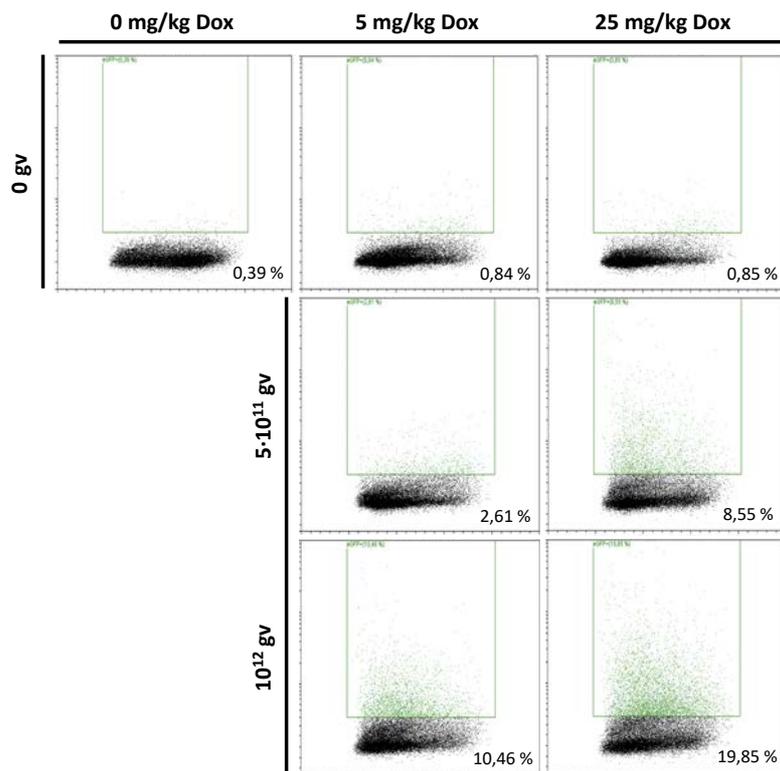


Figura 54.- Expresión hepática de eGFP inducida con Dox *in vivo*. Porcentaje (A) de células positivas y MFI (B) para la expresión de eGFP. Las zonas sombreadas son los valores basales aportados por el animal control sin vector y sin Dox.

3.4.- Experimento terapéutico con vectores TetOn portadores de las moléculas terapéuticas

3.4.1.- Diseño experimental

En el experimento con las moléculas terapéuticas los vectores virales se administraron vía i.v (dosis 10^{12} gv/animal) 14 días antes de la inmunización para dar tiempo suficiente a que el ssDNA de los vectores AAVs se convirtiera en dsDNA. La inducción de la expresión de las moléculas terapéuticas se realizó mediante la administración diaria de una dosis de 25 mg/kg de Dox vía i.p desde el inicio de los primeros síntomas clínicos, es decir, a partir de una puntuación clínica de 0,5. Además del grupo control del experimento al cual se le administro una dosis de 10^{12} gv/animal de AAV8.Null, se introdujeron dos grupos de animales EAE a los que se administró Dox solo a uno de ellos para valorar si el inductor producía alteración alguna sobre la clínica y si era tóxico para los animales en la dosis diaria administrada.

Por otro lado, aparte de los grupos terapéuticos, también se administró la misma dosis i.v del vector AAV8.TetOn.eGFP a tres grupos de animales. Para determinar si la enfermedad podía alterar la expresión del transgén, se incluyeron ocho animales a los que no se les indujo la EAE como control de expresión. En muestras hepáticas de los animales administrados con AAV8.TetOn.eGFP se valoró la expresión de eGFP por citometría de flujo al final de experimento. En resumen, los grupos experimentales fueron (Tabla 23, Figura 55):

Tabla 23.- Grupos experimentales del experimento de aproximación terapéutica con vectores TetOn

| Grupos terapéuticos con EAE | Estudio de toxicidad | Estudio de expresión del transgén |
|--|-----------------------------------|---|
| Grupo TetOn.Null + Dox Grupo TetOn.IL37 + Dox Grupo TetOn.sIL21R + Dox | Grupo EAE + SF Grupo EAE + Dox | Grupo TetOn.eGFP (No EAE) + SF Grupo TetOn.eGFP (No EAE) + Dox Grupo TetOn.eGFP (EAE) + Dox |

Dox: doxiciclina; SF: suero fisiológico

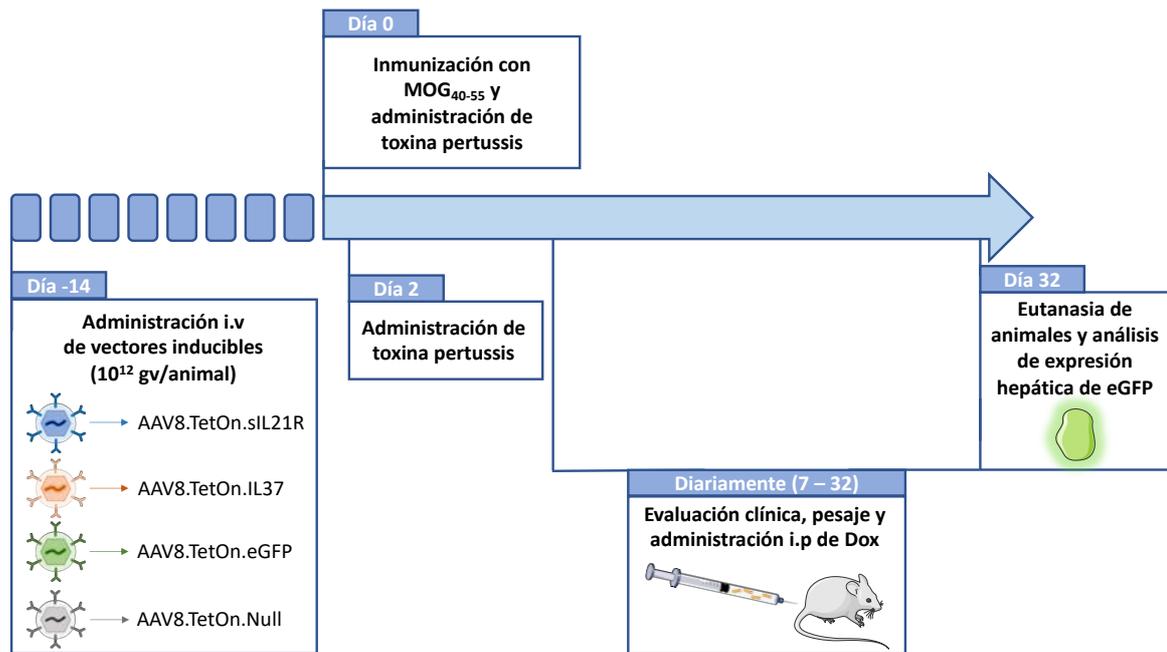


Figura 55- Diseño experimental de aproximación terapéutica con vectores inducibles por Dox.

3.4.2.- Análisis de toxicidad de la Dox en el modelo de EAE

La ventana de dosis de Dox *in vivo* es relativamente amplia, llegando incluso a poder administrarse hasta 50 mg/kg. Sin embargo, desconocíamos el efecto que podía tener sobre un modelo tan sensible como la EAE. Cuando una sustancia resulta tóxica, uno de los primeros indicativos que permite monitorizar dicho efecto es la pérdida apreciable de peso.

Como se aprecia en la figura 56A, al observar macroscópicamente el hígado de los animales sanos a los cuales se les administró diariamente Dox presentaban una inflamación hepática respecto a la apariencia normal que presenta el grupo administrado con SF. Esto se tradujo en una mayor pérdida porcentual del peso, sin embargo, una pérdida de peso de un 2 % respecto al peso inicial no se suele considerar como un hallazgo de toxicidad relevante (Figura 56B). Por otro lado, para valorar si la administración de la Dox producía una elevada toxicidad en el modelo de EAE y si, además, tenía un impacto en el curso clínico, se incluyó un grupo de animales inmunizados (pero sin tratar con el vector viral) al cual se administró Dox. Sin embargo, por problemas ajenos a nuestro procedimiento experimental, dicho grupo tuvo que ser eliminado por una baja incidencia. Por lo que estudiamos el efecto de la Dox en la EAE

en el grupo tratado con el vector AAV8.Null, el cual ya se había demostrado previamente que cuando el vector se administraba de manera preventiva no alteraba el curso clínico. En la figura 56 se muestra que la administración de Dox en los animales EAE null no alteró el AUC de la puntuación clínica media (SF: $32,38 \pm 1,77$; Dox: $31,64 \pm 1,07$; $p = 0,559$) (Figura 56C), ni tampoco afecta de forma significativa al AUC de la variación de peso de ambos grupos (SF: $-34,28 \pm 30,33$; Dox: $-51,38 \pm 15,67$; $p = 0,611$) (Figura 56D).

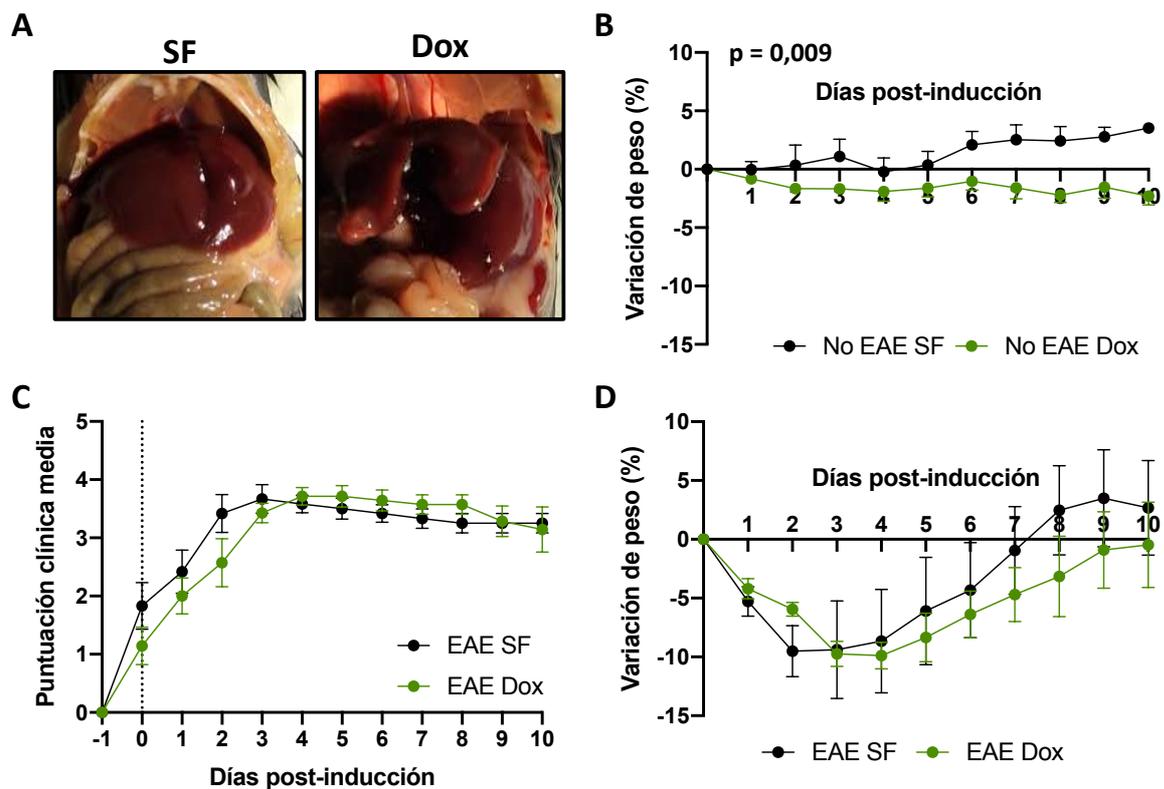


Figura 56.- Valoración de la toxicidad hepática de la Dox en animales sanos y la alteración del curso clínico en animales con EAE. La figura (A) muestra imágenes representativas del estado hepático de animales sanos administrados con Dox. La gráfica (B) representa la variación porcentual del peso de dichos animales. Evolución clínica (C) y variación porcentual del peso (D) de animales con EAE. No EAE [SF (n=5), Dox (n=8)], EAE [SF (n=6) y Dox (n=7)]. Se considera como día 0 al primer día de administración de Dox. Los datos se representan como la media \pm SEM.

3.4.3.- Estudio de la expresión hepática de eGFP

A final de experimento se extrajo un lóbulo hepático de los animales administrados con AAV8.TetOn.eGFP, se procesaron para obtener una suspensión de hepatocitos y se valoró la expresión de eGFP mediante citometría.

Como se puede observar en la figura 57, el sistema inducible era capaz de expresar eficientemente el transgén hasta la fase crónica de la enfermedad, en la cual no se observaron diferencias de expresión entre el grupo EAE y el grupo de animales sanos, tanto en el porcentaje de células eGFP⁺ (No EAE: $19,07 \pm 2,20$; EAE: $16,15 \pm 1,59$; $p = 0,299$) como en la MFI (No EAE: $8459,00 \pm 1022,00$; EAE: $7100,00 \pm 492,20$; $p = 0,251$).

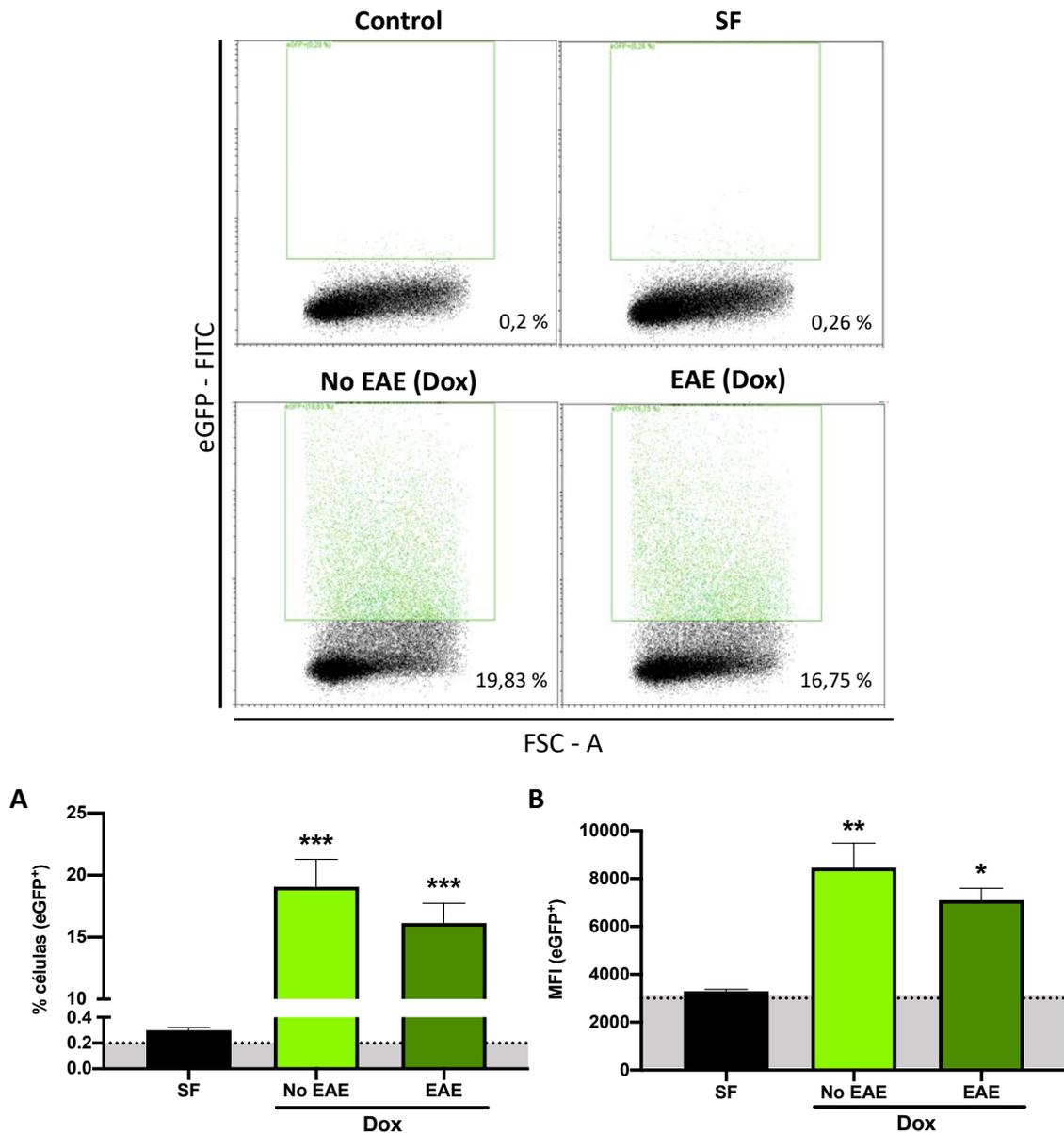


Figura 57.- Expresión hepática de eGFP inducida con Dox en animales sanos y con EAE. Porcentaje de células eGFP⁺ (A) y MFI (B) de los grupos SF (n=3), no EAE (n=8) y EAE (n=8). Las diferencias mostradas son respecto al grupo SF. Las zonas sombreadas son los valores basales proporcionados por los animales control sin vector y sin Dox (n=2). Los datos se representan como la media \pm SEM. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$)

3.4.4.- Resultados clínicos del tratamiento terapéutico con AAV8.TetOn.sIL21R y AAV8.TetOn.IL37

El grupo de animales tratado con el vector AAV8.TetOn.sIL21R desarrolló una clínica significativamente más leve que el grupo control null, lo cual estaba en concordancia con una tendencia a una menor pérdida de peso durante la fase aguda de la enfermedad (Tabla 24). A la vista de los resultados mostrados en la figura 58, se puede deducir que el bloqueo de la IL-21 durante la fase aguda de la enfermedad produce una clínica más leve, lo cual se puede apreciar durante los primeros cinco días en la variación porcentual del peso.

Tabla 24.- Parámetros clínicos del tratamiento terapéutico con AAV8.TetOn.sIL21R

| Grupo experimental | Puntuación clínica (AUC) | Puntuación clínica máxima | Variación de peso (AUC) |
|--------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Null (n = 7) | 31,64 ± 1,07 | 3,86 ± 0,09 | -51,38 ± 15,67 |
| sIL-21R (n = 7) | 25,75 ± 2,82 | 3,29 ± 0,36 | -31,77 ± 15,95 |
| p - valor | 0,043 | 0,339 | 0,384 |

Los datos se presentan como la media ± SEM. AUC: área bajo la curva

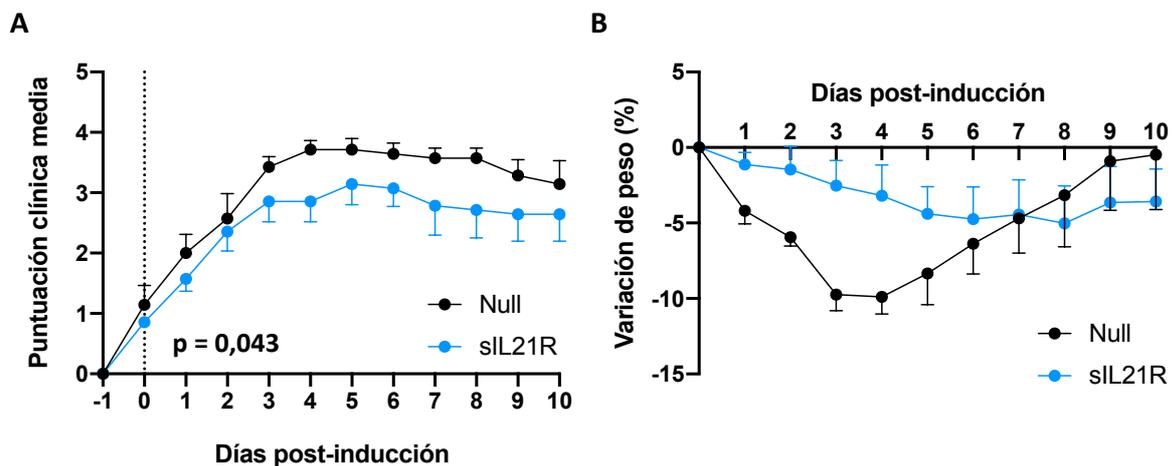


Figura 58.- Resultados clínicos del tratamiento terapéutico con AAV8.TetOn.sIL21R. Seguimiento de la evolución clínica (A) y la variación porcentual del peso (B) del grupo sIL-21R (n=7) y grupo control null (n=7). Se considera como día 0 al primer día de administración de Dox. Los datos se representan como la media ± SEM.

En el caso del tratamiento terapéutico con el vector AAV8.TetOn.IL37, a pesar de los resultados observados en la aproximación preventiva, no se observó efecto terapéutico alguno en el grupo tratado con el vector inducible de la molécula (Tabla 25, Figura 59).

Tabla 25.- Parámetros clínicos del tratamiento terapéutico con AAV8.TetOn.IL37

| Grupo experimental | Puntuación clínica (AUC) | Puntuación clínica máxima | Variación de peso (AUC) |
|--------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Null (n = 7) | 31,64 ± 1,07 | 3,86 ± 0,09 | -51,38 ± 15,67 |
| IL-37 (n = 5) | 29,45 ± 2,78 | 3,60 ± 0,24 | -41,55 ± 22,26 |
| <i>p</i> - valor | 0,755 | 0,470 | 0,717 |

Los datos se presentan como la media ± SEM. AUC: área bajo la curva

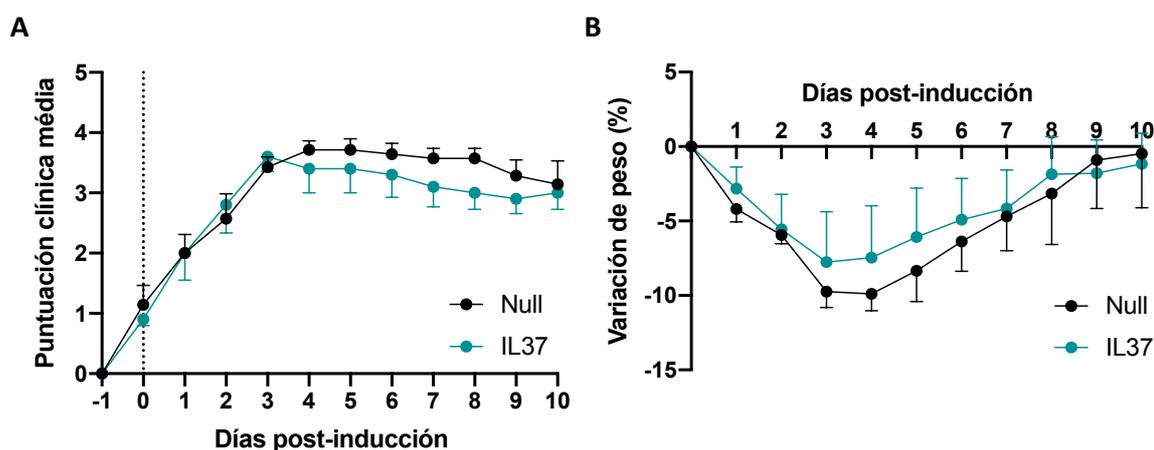


Figura 59.- Resultados clínicos del tratamiento terapéutico con AAV8.TetOn.IL37. Seguimiento de la evolución clínica (A) y la variación porcentual del peso (B) del grupo IL-37 (n=5) y grupo control null (n=7). Se considera como día 0 al primer día de administración de Dox. Los datos se representan como la media ± SEM.

Discusión

1.- Estrategias de terapia génica para el tratamiento de la EM

Aproximadamente el 80% de los pacientes con EM siguen con vida tras 25 años del diagnóstico (Leray et al., 2016), este hecho sumado a que se ha producido un incremento de la prevalencia de la enfermedad en los últimos años genera un mayor número de pacientes crónicos con EM que precisan de tratamiento. Por lo que al impacto social causado por padecer la enfermedad hay que sumar el gran gasto económico y sanitario asociado al tratamiento de estos pacientes.

La EM es una enfermedad que en la actualidad no tiene cura. La mayoría de los tratamientos existentes, denominados modificadores de la enfermedad, están dirigidos a ejercer una regulación del sistema inmune con la finalidad de reducir el número de brotes inflamatorios anuales y retrasar el máximo tiempo posible el avance hacia las formas progresivas de la patología (Lewis and Spillane, 2019). Estos tratamientos, tanto los fármacos biológicos como los no biológicos, implican una administración rutinaria a largo plazo, lo que explica el gran gasto económico de estas terapias. Por otro lado, la capacidad de responder a estos tratamientos por parte de los pacientes se va reduciendo a medida que progresa la enfermedad (Rieckmann et al., 2008). Esto, sumado a que existe una correlación directa entre la efectividad del fármaco y los efectos secundarios, produce que la relación efectividad-seguridad se vaya haciendo cada vez menos favorable teniendo que asumir grandes riesgos para obtener una eficacia inferior a la obtenida al comienzo de la aplicación tratamiento.

El desarrollo de estrategias terapéuticas con vectores virales portadores de moléculas inmunoreguladoras o inmunosupresoras, siendo éstas producidas por el propio organismo del paciente, presenta varias ventajas. La primera es que mediante una única administración el organismo es capaz de sintetizar la molécula terapéutica sin precisar de una administración reiterada de la proteína exógena. La segunda, al tratarse de una molécula endógena el perfil de seguridad se ve incrementado, así como la efectividad de éste aumentando la capacidad del paciente a responder al tratamiento previsiblemente durante un largo periodo de tiempo.

Del total de ensayos clínicos de terapia génica, el 26% se llevan a cabo con vectores Ads y AAVs, siendo éstos los vectores virales más importantes para la aplicación de estrategias de terapia génica *in vivo* (Edelstein, 2019). Los vectores Ads son los más utilizados debido a su gran eficiencia y rapidez para alcanzar la máxima expresión del transgén en un amplio rango de tejidos, sin embargo, su alta capacidad para desencadenar una respuesta inmune los hace que sean poco aconsejables para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Sin embargo, los vectores AAVs a pesar de presentar ciertas limitaciones, como su baja capacidad de encapsidación y su relativa lentitud para expresar el transgén, su bajo potencial inflamatorio los convierte en vectores ideales para el tratamiento de enfermedades que cursan con mediación del sistema inmune, como la EM (Thomas et al., 2003).

En primer lugar, nos planteamos realizar una aproximación preventiva de los tratamientos aplicados en el presente trabajo. Debido a que los vectores AAVs precisan de al menos dos semanas para alcanzar el máximo nivel de expresión del transgén (Miao et al., 1998; Xiao et al., 1998) en los experimentos de estas características se realizó una administración sistémica de los vectores virales tres semanas antes de la inmunización de los animales. El modelo de EAE se caracteriza por presentar un estado hiperreactivo del sistema inmune, especialmente en la fase aguda de la enfermedad, por lo que se debía demostrar que la administración sistémica de los vectores virales no producía ninguna alteración clínica ni inmunológica del modelo. Con los experimentos realizados se ha podido demostrar que la administración de vectores AAVs tres semanas antes de la inducción de la EAE no afecta al curso clínico ni a los hallazgos histopatológicos de la enfermedad así como tampoco a la respuesta proliferativa policlonal o antígeno-específica de los esplenocitos. Teniendo en cuenta que la clarificación total del vector viral en sangre se produce tras solo cuatro días después de la administración (Kotchey et al., 2011), estos resultados eran esperables debido a que en el momento de la inmunización no había presencia de partículas virales en sangre por lo que la posibilidad de desencadenar una respuesta contra las cápsides virales era mínima.

El siguiente paso supuso la administración de los vectores AAVs para la realización de una aproximación terapéutica. Un estudio previo realizado en nuestro grupo en el cual

se comparó la expresión de β -galactosidasa cuando los vectores eran administrados días posteriores a la inmunización (días +5 y +9) respecto a cuando estos eran administrados en días previos (día -6 y -2) concluyó que la expresión del transgén era significativamente inferior cuando los vectores virales eran administrados una vez realizada la inducción de la enfermedad (Miralles et al., 2017).

Teniendo en cuenta estos resultados y la cinética de infección de los AAVs se decidió duplicar la dosis viral administrada en las aproximaciones preventivas y realizar la administración de los vectores en días cercanos al día de la inmunización (días -1 y +1) para hacer coincidir la máxima expresión del transgén con el inicio de la sintomatología clínica. Al comparar los parámetros clínicos de los respectivos grupos null con un grupo null administrado en el abordaje preventivo (día -21) se pudo determinar que la administración de los vectores AAVs en días próximos a la inmunización (días -1 y +1) modificaba el curso clínico de la enfermedad haciendo que éste fuese más leve. Esta observación se puede explicar en base a que cuando se realizó la inducción de la EAE aún había presencia de partículas virales en sangre y atendiendo al protocolo de inmunización del modelo de EAE en el cual se produce una activación considerable del sistema inmune debido a la administración del CFA y la toxina pertussis, se podría hipotetizar que se estaba induciendo una respuesta inmune dirigida contra la cápside viral en detrimento de la respuesta contra el péptido encefalitogénico. Pese a esta observación, pudimos comprobar que en el hígado de los animales tratados con el vector terapéutico había presencia tanto de partículas virales infectivas como de expresión del transgén, sin embargo, no se pudo determinar si se había producido un efecto de eliminación del vector por el sistema inmune ya que para ello se precisaba de un grupo control administrado con la misma dosis 21 días antes de la inducción de la EAE. Estos resultados están en consonancia con un estudio realizado con terapia génica en el modelo de EAE en el cual se observó que al administrar los vectores AAVs tras la inmunización la eficacia del tratamiento era considerablemente inferior a cuando se administraba rapamicina, un potente inmunosupresor, días previos a la administración de los vectores virales (Keeler et al., 2018).

Con todas estas evidencias pudimos concluir que la administración preventiva de vectores AAVs no alteraba la progresión de la enfermedad del modelo, mientras que la administración en días cercanos a la inducción de la enfermedad probablemente desencadenaba una respuesta inmune contra las cápsides virales, por lo que el uso de vectores AAVs de expresión constitutiva en las condiciones experimentales utilizadas no era adecuada para el desarrollo de aproximaciones terapéuticas en el modelo de EAE.

Para llevar a cabo una aproximación terapéutica en ausencia de respuesta inmune producida por la cápside viral se optó por la utilización de vectores inducibles, los cuales nos permitía realizar una administración previa a la inmunización e inducir la expresión de las moléculas terapéuticas en el momento de la aparición de los primeros síntomas clínicos. De esta manera se pudo realizar un abordaje terapéutico en ausencia de partículas virales en sangre en el momento de la inducción de la enfermedad, sin embargo, el uso de un sistema inducible por Dox nos obligó a considerar la influencia que podía tener el inductor sobre la clínica y su toxicidad en el modelo animal.

Por un lado, en base a la bibliografía disponible, se decidió realizar una administración de la Dox cada 24h ya que de este modo se conseguiría obtener unos niveles constantes de las moléculas terapéuticas en sangre (Zabala et al., 2004). Por otro lado, la dosis de 25 mg/kg se seleccionó en base a un estudio en el cual se observaba que esa dosis era la máxima tolerada en ratones a partir de la cual ya no se producía un incremento lineal de la expresión del transgén (Vanrell et al., 2011). Ambas condiciones se ratificaron en un estudio piloto *in vivo* en el cual se seleccionó una dosis viral de 10^{12} gv/animal ya que previamente habíamos confirmado que reportaba unos niveles de expresión aceptables. En la mayoría de experimentos, la inducción del sistema TetOn se realiza con una primera dosis de Dox vía i.p seguido de un mantenimiento con el inductor disuelto en el agua de bebida (Vanrell et al., 2011). Sin embargo, debido al incremento de la discapacidad motora que caracteriza al modelo de EAE, la cual les dificulta el acceso de los animales al biberón, la Dox tuvo que ser administrada vía i.p hasta final de experimento, lo que incrementaba la biodisponibilidad de Dox y con ello el riesgo de toxicidad.

Cuando una sustancia resulta tóxica para un animal, uno de los primeros síntomas apreciables es una pérdida de peso (Hoffman et al., 2002). Teniendo en cuenta la bibliografía disponible se consideró una pérdida del 15% respecto al peso inicial como criterio para una reducción de la dosis administrada (Aston et al., 2017). Se observó que la administración de Dox en animales sanos producía una evidente pérdida de peso. Sin embargo, dicha pérdida de peso no superaba el límite establecido, por lo que se mantuvo la dosis de Dox hasta final de experimento. En el modelo de EAE, al comparar el curso clínico y la pérdida porcentual de peso entre animales tratados con Dox y animales tratados con vehículo (SF) no se observaron diferencias, lo que indicaba que la relativa toxicidad observada en animales sanos no era relevante en animales con EAE. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que el uso de tetraciclinas a largo plazo, a pesar de no producir una toxicidad apreciable en la variación de peso sí que afecta al metabolismo mitocondrial disminuyendo los niveles de ATP (Moullan et al., 2015). De manera que, estos vectores pueden resultar muy útiles para el desarrollo de estudios pre-clínicos con animales pero para su traslación a humanos se deberían tener en cuenta otros sistemas de expresión inducibles cuyos inductores no generen alteraciones metabólicas. Finalmente, también se valoró la capacidad de expresión *in vivo*, mediante la detección de la expresión de eGFP, observándose que el sistema inducible funcionaba eficientemente en animales con EAE, validando así su utilidad para futuros experimentos terapéuticos con vectores virales en este modelo animal.

2.- Modulación de la respuesta inmune mediante vectores virales codificantes del receptor soluble de la IL-21

La pleotropicidad y el amplio rango de acción de la IL-21 sobre los componentes del sistema inmune, tanto innato como adaptativo, han situado a esta citoquina en el eje central de diversas patologías como el cáncer y las enfermedades inmunomediadas como la EM, RA, SLE o diabetes de tipo 1 (Spolski and Leonard, 2008). Numerosos estudios en modelos animales y en humanos han demostrado la importancia de la IL-21 en dos grandes áreas de tratamiento. La primera, en la inmunoterapia del cáncer mediante el aumento de los niveles de IL-21 con el objetivo de incrementar la capacidad citotóxica de las células del sistema inmune (Santegoets et al., 2013). La segunda, el

bloqueo de la señalización de la citoquina como tratamiento de enfermedades autoinmunes, siendo ésta la que se desarrolla en el presente trabajo mediante una estrategia de terapia génica para el tratamiento de la EM.

Existen diversas estrategias disponibles destinadas a ejercer un bloqueo de la interacción de la IL-21 con su receptor, siendo las más importantes el uso de anticuerpos dirigidos bien contra la IL-21 o bien contra su receptor, IL-21R. Sin embargo, existe una tercera estrategia que se basa en la utilización de factores solubles capaces de bloquear la citoquina. En este último caso existe una proteína de fusión comercial denominada IL-21R-Fc capaz de bloquear la interacción IL-21/IL-21R, la cual está constituida por la región extracelular del IL-21R junto con la fracción constante de una inmunoglobulina. La actividad antagónica de esta proteína ya ha sido ampliamente estudiada e inclusive se sigue utilizando como control positivo para el desarrollo de nuevos anticuerpos específicos contra la citoquina (Maurer et al., 2012). Además, el tratamiento con esta molécula ya ha sido testado en modelos animales de diversas enfermedades autoinmunes como la RA (Young et al., 2007), el SLE (Bubier et al., 2007) y la diabetes de tipo 1 (McGuire et al., 2011), observándose en todos ellos una reducción de la severidad clínica y una disminución de la respuesta inflamatoria. Teniendo en cuenta las diversas evidencias que relacionan la IL-21 con la inmunopatogenia de la EM y los resultados obtenidos en otras enfermedades autoinmunes estrechamente relacionadas como la RA nos decidimos por aplicar una estrategia similar mediante terapia génica en el modelo de EAE.

Dado que la molécula IL-21R-Fc se encontraba protegida por una patente comercial, nos decantamos por diseñar un nuevo receptor soluble al que denominamos sIL-21R. Este consistía únicamente en la región extracelular del IL-21R junto con una señal de secreción. Al tratarse de una molécula íntegramente endógena hipotetizamos que se reduciría considerablemente la generación de anticuerpos neutralizantes, al menos a corto plazo, lo que implicaría una mejora de la eficacia terapéutica. Además, al utilizar una estrategia de terapia génica no teníamos que preocuparnos en aumentar la vida media de la molécula debido a que su expresión constante en el tiempo nos permitía

prescindir de secuencias estabilizantes como el Fc que contiene la proteína de fusión comercial.

Antes de proceder con los estudios *in vivo*, se debía demostrar que el sIL-21R diseñado presentaba las características deseadas. Para ello, en primer lugar, se generó un vector Ad portador de la secuencia codificante. Mediante la infección de células en cultivo se pudo comprobar la localización citoplasmática del receptor y que además éste era secretado eficientemente al poder ser detectado en el SN de las células transducidas. En cuanto a la funcionalidad antagónica del sIL-21R, no se pudo demostrar mediante técnicas de interacción directa como el *Western-Blot* no desnaturalizante, debido probablemente a que la interacción de las moléculas se perdía durante la realización de la técnica. Finalmente, la capacidad de bloqueo pudo confirmarse al demostrarse una disminución de la señalización intracelular de la fosforilación de Stat3 cuando se realizaba una incubación de la IL-21 con el sIL-21R en cultivos primarios de esplenocitos de ratón, estudio funcional ampliamente utilizado para la validación de anticuerpos destinados al bloqueo de diversas citoquinas (Zhu et al., 2013).

2.1.- Tratamiento preventivo con sIL-21R en el modelo de EAE

En primer lugar, se decidió comenzar testando el potencial terapéutico del bloqueo de la IL-21 mediante la administración de vectores AAVs de expresión constitutiva en una aproximación preventiva para valorar la capacidad protectora del tratamiento. Para ello se generaron vectores AAV8, los cuales se caracterizan por su fuerte tropismo hepático (Sands, 2011), con la molécula terapéutica clonada bajo el control del promotor CMV. Dado que el origen de la respuesta autoinmune en el modelo de EAE tiene lugar en periferia (Constantinescu et al., 2011; Robinson et al., 2014) se realizó una administración sistémica de los vectores. Tras la realización de dos experimentos independientes bajo las mismas condiciones experimentales, en ambos estudios se pudo observar una mejora clínica del grupo tratado con el vector AAV8.CMV.sIL21R respecto al grupo administrado con el vector null debido a un menor número de animales que desarrollaba la enfermedad, consiguiendo una reducción de la incidencia en casi un 40 % respecto al grupo control. Dichos resultados clínicos se corroboraron al valorar la

afectación histopatológica, observándose que los animales tratados con el vector portador del sIL-21R presentaban una menor infiltración de células T, desmielinización, activación microglial y daño axonal en el SNC.

Estos experimentos nos permitieron validar el potencial terapéutico del bloqueo de la IL-21 antes de que se inicie la respuesta inmune en el modelo animal. Los resultados obtenidos estaban en consonancia con un estudio realizado en el modelo de EAE en el que se demostraba que la administración exógena de IL-21 durante los siete días previos a la inmunización desencadenaba una clínica más severa (Vollmer et al., 2005). Resultados similares arrojó un estudio en el que los animales KO para la IL-21 desarrollaban una EAE más leve que su respectivo control *wild type* (Nurieva et al., 2007). Además, un estudio reciente en el modelo espontáneo de EAE en ratones 2D2 KO para el IL-21R determinó que la señalización de la IL-21 es crítica para el desarrollo de la patología (Lee et al., 2015). Sin embargo, los estudios realizados con animales KO para IL-21 e IL-21R muestran resultados contradictorios, ya que también existe bibliografía que muestra que la ausencia de señalización de la IL-21 hace que los animales desarrollen una patología más severa (Coquet et al., 2008; Liu et al., 2008). Otro estudio en el que se administró el IL-21R-Fc dos días antes de la inmunización en un modelo remitente-recurrente también reveló un empeoramiento de la clínica (Piao et al., 2008), sin embargo, ha de tenerse en cuenta que la generación de este modelo implica el uso de una cepa de ratón diferente (SJL/J) y la inmunización con el péptido PLP₁₃₉₋₁₅₁, a diferencia del péptido MOG₄₀₋₅₅ utilizado en nuestro modelo. Estos resultados tan contradictorios pueden explicarse en base a los diferentes *backgrounds* genéticos de los animales transgénicos, diferencias en los protocolos de inmunización y aproximaciones experimentales aplicadas. Además, se debe tener en cuenta que los animales KO para elementos del sistema inmune acaban desarrollando mecanismos compensatorios capaces de suplir las funciones de la proteína ausente, y más aún en citoquinas de carácter pleiotrópico (Kreiner, 2015; El-Brolosy and Stainier, 2017). Todo ello pone de manifiesto la importancia de alcanzar una homogeneidad del modelo para realizar una comparativa de los resultados, especialmente en aquellas estrategias que involucran a citoquinas tan pleiotrópicas como la IL-21.

También se realizó un estudio del perfil inmunológico en esplenocitos tanto en la fase aguda (día 15 p.i.) como en la fase crónica (día 27 p.i.). En primer lugar, se pudo detectar que los animales tratados con sIL-21R presentaban una mayor expresión génica de $TGF\beta$ -1 en los esplenocitos en la fase aguda, molécula que entre sus funciones principales se encuentra la de actuar como potente inductor de tolerancia reduciendo la activación de células T $CD4^+$ (Gilbert et al., 1997; Chen et al., 2003), lo cual podría explicar la reducción en el porcentaje de células T $CD4^+$ activadas en fase aguda en los ratones tratados con sIL-21R. Estudios previos han demostrado que el bloqueo del $TGF\beta$ -1 mediante el uso de anticuerpos específicos producía un incremento de la severidad clínica de la EAE, mientras que su administración exógena generaba una protección frente al desarrollo de la patología, lo que demuestra el papel beneficioso que tiene esta citoquina en la enfermedad (Racke et al., 1991; Johns et al., 1991; Johns et al., 1993). Por otro lado, también está ampliamente estudiado que el $TGF\beta$ es una molécula clave en el balance de la respuesta Th17/Treg, dependiente de la presencia principalmente de la IL-6, aunque también de la IL-21 (Gutcher et al., 2011). Sin embargo, no se pudo observar una alteración en la frecuencia de células Th17 ni de células Tregs así como en la expresión génica de los factores de transcripción que caracterizan ambas poblaciones, lo cual puede ser argumentado porque a pesar de que la IL-21 es capaz de inducir la diferenciación hacia Th17 en presencia de $TGF\beta$, esta función puede ser eficazmente compensada por la presencia de IL-6 (Coquet et al., 2008), lo que explica que el bloqueo de la IL-21 como monoterapia no produzca una regulación efectiva de estas poblaciones celulares, al menos en nuestro modelo animal. Este fenómeno está respaldado por un estudio reciente en el cual se determinó que un tratamiento combinado para bloquear la IL-6 y la IL-21 en el modelo de RA inducida por colágeno desencadenaba un efecto sinérgico disminuyendo significativamente el número de células Th17 (Roeleveld et al., 2017). En los estudios por qPCR en fase aguda también se observó una mayor expresión de Gata3, factor de transcripción característico de la población celular Th2, sin embargo, dicha observación no se vio apoyada por un incremento del porcentaje de células productoras de IL-4 ni de los niveles de la citoquina en el SN de esplenocitos estimulados con el antígeno encefalitogénico. Cabe mencionar que los estudios de expresión por qPCR también se realizaron en el SNC en la fase aguda, sin embargo, no se observó diferencia alguna en la expresión de las moléculas

estudiadas, lo que confirmaba la hipótesis inicial en la que se consideró que el tratamiento con sIL-21R ejercería una modulación de la respuesta inmune a nivel periférico.

En fase aguda también se observó una disminución del porcentaje de células NK activadas en los animales tratados con el vector terapéutico. Existen estudios que apoyan que la actividad de la IL-21 sobre la funcionalidad de las células NK murinas no es muy relevante, a diferencia de lo que ocurre con las humanas (Skak et al., 2008). Esto podría indicar que a pesar de que la diferencia era estadísticamente significativa, a nivel biológico una reducción del 3% de la población no resulte relevante. Sin embargo, también existen resultados contradictorios respecto a este tema. Así uno de los estudios realizados con ratones KO para el IL-21R asocian el empeoramiento clínico observado con una reducción del número de células NK (NK1.1⁺ CD3⁻) y, además, la administración de un anticuerpo anti-NK1.1 en animales *wild type* producía un aumento de la severidad clínica de la enfermedad (Xu et al., 2005; Liu et al., 2008). Sin embargo, en nuestros resultados no hemos llegado a observar una reducción de las poblaciones de células NK y NKT, ambas NK1.1⁺.

El grupo administrado con AAV8.CMV.sIL21R también presentó una mayor activación de DCs en fase aguda. Estos resultados son acordes a la bibliografía existente, dado que se conoce que la IL-21 es capaz inhibir la maduración y activación de este tipo celular reduciendo la expresión en superficie de MHC II, CD80 y CD86 y la secreción de TNF α por parte de estas células (Brandt et al., 2003; Strengell et al., 2006). Las células DCs activadas son una de las principales fuentes de síntesis de IL-18 (Dinarelli et al., 2013), citoquina capaz de activar una respuesta Th1, principal tipo celular productor de IFN γ y TNF α (Nakanishi et al., 2001). Todas estas evidencias podrían establecer una relación entre los resultados inmunológicos obtenidos con nuestro tratamiento en los que se obtuvo una mayor expresión génica de Tbx21 en fase aguda (principal factor de transcripción de células Th1) y los niveles incrementados de las citoquinas IL-18, TNF α e IFN γ en el SN de los esplenocitos estimulados con el péptido encefalitogénico en fase crónica. Sin embargo, el incremento de los niveles de TNF α e IFN γ no se pueden considerar como un efecto unívocamente negativo del tratamiento ya que estas

moléculas son unas de las más controvertidas en el papel que desempeñan en la EAE y la EM. Mientras que los tratamientos anti-TNF α mostraron ser eficaces en el modelo de EAE inducido por transferencia pasiva, esto no ocurría cuando el modelo era generado por inducción activa (Teuscher et al., 1990; Selmaj et al., 1991). Inclusive, la administración exógena de TNF α a ratones KO para la citoquina los rescataba de una mayor severidad de la EAE (Liu et al., 1998) mientras que ensayos clínicos con pacientes de EM a los que se les administró un tratamiento con un receptor soluble de TNF α (Lenercept) produjo un empeoramiento clínico y tuvo que ser interrumpido (van Oosten et al., 1996; Arnason et al., 1999). Por otro lado, aunque la transferencia de células Th1 autorreactivas productoras de IFN γ puede inducir la EAE (Domingues et al., 2010), se ha observado que la administración de anticuerpos anti-IFN γ provoca una exacerbación de la clínica (Lublin et al., 1993; Heremans et al., 1996; Billiau et al., 1998). Además, la administración exógena de IFN γ genera un efecto protector en el modelo animal (Heremans et al., 1996; Billiau et al., 1998), a diferencia de lo que ocurre en humanos en los que resulta en una exacerbación de la EM (Panitch et al., 1987).

En los estudios de citometría en fase crónica se observó que el grupo tratado con sIL-21R presentaba una reducción del número de células T CD4⁺ productoras de IL-10, lo cual era contrario a lo esperado debido a la mejora clínica observada en los animales. Sin embargo, este fenómeno se puede asociar a que los animales al experimentar una menor respuesta pro-inflamatoria inicial precisaron de una menor respuesta reguladora compensatoria mediada por la IL-10 y no a un efecto inhibitorio del tratamiento.

Finalmente, el tratamiento con AAV8.CMV.sIL21R no produjo una alteración en la respuesta proliferativa de los esplenocitos frente a la MOG₄₀₋₅₅ ni en la fase aguda ni en la fase crónica de la enfermedad. En el modelo de EAE la incidencia de la enfermedad puede ser variable entre experimentos y laboratorios. En nuestra experiencia ésta oscila entre el 70 y 100%. Todos los animales que no desarrollaron la enfermedad, tanto los tratados con el vector terapéutico como el animal tratado con el vector null, presentaban una respuesta proliferativa frente al péptido encefalitogénico, indicativo de que se había desarrollado correctamente la respuesta autoinmune. Por ello, asumimos

que la reducción de la incidencia de la enfermedad en el grupo tratado con sIL-21R se debía al efecto terapéutico del tratamiento.

2.2.- Tratamiento terapéutico con sIL-21R en el modelo de EAE

El siguiente paso fue estudiar el efecto del tratamiento con sIL-21R en una aproximación terapéutica con vectores AAVs de expresión constitutiva. En contraste con los resultados clínicos obtenidos en la aproximación preventiva, al analizar las variables clínicas de los animales incidentes, los animales tratados con el AAV8.CAG.sIL21R presentaban un curso clínico más severo y desarrollaban la enfermedad antes que los animales control, aunque las diferencias únicamente eran estadísticamente significativas en los animales tratados a día -1.

Teniendo en cuenta que aunque la máxima expresión del transgén se obtiene tras dos semanas, un vector AAV es capaz de iniciar su expresión a un nivel bajo tras pocos días desde su administración (Zincarelli et al., 2008), por lo hipotetizamos que al administrar los vectores virales en días cercanos a la inmunización se estaría produciendo un bloqueo parcial de la IL-21 durante la fase de desarrollo de la respuesta inmune. De esta manera con los datos clínicos observados pudimos suponer que el bloqueo parcial de la IL-21 circulante durante los primeros siete días p.i podía estar generando un efecto contraproducente y potenciador de la función pro-inflamatoria de la interleuquina. La variación de la funcionalidad de una citoquina en función de su biodisponibilidad es un fenómeno frecuente, por ejemplo, las células Tregs precisan de la IL-2 y su señalización a través del CD25 para su supervivencia y el mantenimiento de su capacidad supresora (Fan et al., 2018), sin embargo, en un estudio reciente se determinó que el bloqueo parcial de la señalización de IL-2/CD25 permitía una mayor expansión y función supresora de este tipo celular debido a la compleja relación existente entre la cantidad de citoquina libre disponible y la abundancia relativa del receptor en los diferentes tipos celulares diana (Wilkinson et al., 2017). Para obtener mayor conocimiento sobre el efecto de la inhibición, probablemente parcial, de la IL-21 en la fase inicial de la respuesta inmune en este abordaje terapéutico temprano serían necesarios estudios de farmacocinética adicionales que sean capaces de establecer una relación entre los

niveles del receptor soluble, de IL-21 circulante y el efecto clínico durante la fase inicial de la respuesta inmune.

Una vez validados los vectores virales inducibles diseñados se procedió a comprobar si el bloqueo de la IL-21 tras la aparición de los primeros signos neurológicos en fase aguda producía una mejora clínica como la observada en la administración preventiva o bien producía un incremento de la severidad clínica como ocurría en la aproximación terapéutica temprana. En este caso, los animales administrados con AAV8.TetOn.sIL21R, tras la inducción de la expresión del sIL-21R por Dox, desarrollaron una clínica menos severa que su grupo control. Sin embargo, la mejora clínica observada con el tratamiento nos hizo pensar que la contribución de la IL-21 una vez establecidos los síntomas clínicos no es tan relevante como la que tiene en la iniciación de la respuesta inmune ya que a pesar de que los mayores niveles de IL-21 se producen durante el desarrollo de la respuesta inmune y en la fase aguda de la patología (Liu et al., 2008), en un estudio se observó que la administración de IL-21 exógena a partir del día 9 p.i no generó un empeoramiento apreciable de la clínica (Vollmer et al., 2005).

Por otro lado, el bloqueo de la IL-21 mediante la administración terapéutica del IL-21R-Fc ha sido eficaz en otros modelos animales de enfermedades autoinmunes como la RA (Young et al., 2007) o el SLE (Bubier et al., 2007), provocando una reducción de la severidad clínica y un aumento de la tasa de supervivencia. Sin embargo, debido a la ausencia de bibliografía existente de este tipo de aproximaciones en el modelo de EAE que nos permita comparar los resultados obtenidos, se pone de manifiesto la necesidad de realizar estudios clínicos e inmunológicos adicionales que permitan determinar el potencial terapéutico del tratamiento con sIL-21R una vez establecidos los primeros signos neurológicos.

3.- Terapia anti-inflamatoria mediante vectores virales codificantes de la IL-37 humana

En esta parte del trabajo se estudió el potencial terapéutico de la IL-37 humana mediante terapia génica en el modelo murino de EAE. Los efectos anti-inflamatorios que

ejerce la IL-37 sobre el sistema inmune tanto innato como adaptativo observados en ratones IL-37tg así como el tratamiento de ratones *wild type* con IL-37 recombinante han demostrado la capacidad que tiene esta citoquina para regular las respuestas inflamatorias perjudiciales y prevenir un daño tisular mediado por el sistema inmune. Múltiples estudios confirman el papel regulador que juega la IL-37 en diversas patologías como el cáncer y enfermedades infecciosas, metabólicas y autoinmunes como la RA, el SLE, la psoriasis, la enfermedad de Crohn o la EM (Jia et al.,2018). Los pacientes de EM presentan niveles superiores de esta citoquina en suero respecto a pacientes sanos, estableciéndose una correlación directa entre los niveles de IL-37 y la severidad clínica, lo que parece indicar que se trata de un mecanismo compensatorio de la respuesta inflamatoria (Farrokhi et al., 2015). Esta evidencia junto con la eficacia ya testada del tratamiento con IL-37 en otras enfermedades autoinmunes, hacía pensar que podía tratarse de un tratamiento potencialmente efectivo para controlar la respuesta inflamatoria desencadenada en la EM.

3.1.- Tratamiento preventivo con IL-37 en el modelo de EAE

Inicialmente se decidió comenzar testando el efecto protector de la IL-37 en su forma de pre-proteína (pre-IL37) bajo el control del promotor CMV, de forma similar al ratón transgénico de la citoquina (Nold et al., 2010). No obstante, la administración del AAV8.CMV.pre-IL37 no reportó ninguna mejora en los ratones tratados. Teniendo en cuenta que la IL-37 se trata de una citoquina de carácter dual capaz de ejercer su acción anti-inflamatoria tanto vía extracelular como por su traslocación al núcleo (Bulau et al., 2014; Cavalli and Dinarello, 2018), hipotetizamos que la ausencia de efecto podía deberse a la propia estrategia de terapia génica empleada ya que el ratón IL-37tg expresa la citoquina en todas las células del organismo, incluidas las células diana, mientras que mediante nuestra estrategia de terapia génica se produce una expresión hepática únicamente ejerciendo una función anti-inflamatoria por la vía extracelular por unión al receptor en las células diana. Por otro lado, la generación de la caspasa-1 activa (necesaria para el procesamiento de la pre-IL-37) es dependiente de señales pro-inflamatorias mediadas por la señalización a través de receptores TLR (Franchi et al., 2009) o estrés oxidativo (Sun et al., 2013) y el hígado presenta niveles bajos de

expresión de receptores TLR y de las moléculas de señalización asociadas a estos receptores comparado con otros órganos (Mencin et al., 2009). Estas evidencias parecerían indicar que las células hepáticas productoras de la proteína terapéutica no estaban respondiendo de manera eficiente a la respuesta inflamatoria desencadenada en la inducción de la EAE y, por tanto, no se estaba generando un procesamiento eficiente de la pre-proteína.

Tras este resultado se decidió testar directamente el efecto protector de la citoquina en su forma madura (IL-37₄₆₋₂₁₈). Para ello, en una segunda etapa se clonó el gen terapéutico bajo el promotor CMV y se generó el vector AAV8 codificante de la forma procesada de la proteína. La administración i.v de AAV8.CMV.IL37 tampoco reportó diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado y el control, sin embargo, se pudo apreciar que los animales del grupo terapéutico presentaban una severidad clínica ligeramente más leve durante la fase crónica. Con los resultados disponibles no se pudo llegar a una conclusión, pero se hipotetizó que podía tratarse de una cuestión de insuficiencia de los niveles de producción de la proteína por debajo del rango terapéutico a pesar de que los vectores virales expresaban eficientemente el transgén. Por ello, el gen terapéutico se clonó bajo el promotor CAG, que permite una mayor expresión del transgén. En estas condiciones se observó una tendencia a una clínica más leve del grupo terapéutico debido a un efecto protector del tratamiento, lo cual estaba en consonancia con una tendencia a un mejor estado histopatológico del SNC de los animales tratados con la citoquina. Nuestros resultados se encuentran en consonancia con los obtenidos en un estudio realizado recientemente en el que se observó que los animales IL-37tg desarrollaban una EAE menos severa que sus respectivos controles *wild type* (Sánchez, 2019). Esta función protectora de la citoquina también ha sido demostrada en modelos animales de otras enfermedades autoinmunes como la enfermedad de Crohn (McNamee et al., 2011) o la RA (Cavalli et al., 2016), en los cuales los animales IL-37tg estaban protegidos frente al desarrollo de colitis inducida mediante DSS o el desarrollo de una patología reumática severa al administrarse la proteína recombinante previa a la inducción de la enfermedad en animales *wild type*.

Se estudió el perfil inmunológico de los animales tratados con AAV8.CAG.IL37 tanto en la fase aguda como en la crónica. Mientras que en la fase crónica no se observaron diferencias entre los grupos de tratamiento en cuanto a las poblaciones inmunes, la proliferación policlonal o antígeno-específica ni en la producción de citoquinas, en fase aguda se pudieron apreciar diferencias en el perfil inmunológico de los animales tratados con AAV8.CAG.IL37 respecto a los tratados con el vector null. Acorde a lo ya descrito en la bibliografía se pudo comprobar que el tratamiento con IL-37 produjo una supresión del sistema inmune innato y una inducción de tolerancia observándose un menor porcentaje de células mieloides y menor estado de activación de las DCs en el grupo terapéutico (Nold et al., 2010; Luo et al., 2014; Chen and Fujita, 2015), lo que se traduce en una reducción de la respuesta pro-inflamatoria observada en un menor porcentaje de células T CD4⁺ activadas y células T productoras de IL-17 e IFN γ , resultados que correlacionan con lo ya descrito en la bibliografía en la que se defiende que la IL-37 también ejerce su función anti-inflamatoria mediante una inhibición de las respuestas Th1, Th2 y Th17 (Ye et al., 2015; Pan et al., 2020). Esto último también explicaría la reducción de los niveles de IL-4 detectados en el SN de los esplenocitos estimulados con MOG₄₀₋₅₅. En el grupo tratado con IL-37 también se apreció un aumento en el porcentaje de DCs linfoides, sin embargo, este tipo celular no presentaba un estado de activación mayor que su grupo control. No existe bibliografía disponible que establezca una relación entre esta población celular y el tratamiento con IL-37, pero diversos estudios han asociado un papel tolerogénico a estas células de origen linfóide (McLellan and Kämpgen, 2000), lo que podría tratarse de un efecto beneficioso del tratamiento. De manera contraria a lo expuesto en la bibliografía, la cual defiende que la IL-37 es capaz de aumentar el número y la actividad supresora de las células Tregs (Shuai et al., 2015; Wang et al., 2016), en nuestros resultados se obtuvo un menor porcentaje de células Tregs y de células T CD4⁺ productoras de IL-10 en el grupo terapéutico. Sin embargo, al igual que ocurría con el tratamiento con sIL-21R, hipotetizamos que al estar actuando en un punto tan inicial de la respuesta inmune mediante una aproximación preventiva, los animales tratados con el vector terapéutico estaban desarrollando una menor respuesta inflamatoria y, por tanto, precisaban de una menor respuesta reguladora compensatoria.

Sorprendentemente, se observó que los animales tratados con IL-37 presentaban un mayor porcentaje de células T CD8⁺ en la fase aguda, lo que también se evidenciaba en un mayor porcentaje de la población total de células T CD3⁺ y en una tendencia a una mayor respuesta proliferativa policlonal al estimular los esplenocitos con PHA. En base a que se observó un menor porcentaje de células T CD8⁺ productoras de IFN γ y, además, a que tampoco se produjo una alteración ni de la respuesta proliferativa antígeno-específica de los esplenocitos ni en los niveles de IFN γ y TNF α en el SN de dichos estudios, todo parecía indicar que no se trataba de un perfil de células T CD8⁺ efectoras. Además, ratones KO para células T CD8⁺ son más susceptibles a desarrollar la EAE y lo hacen con una severidad mayor que los ratones *wild type* lo que sugiere que las células T CD8⁺ también tienen un papel protector, el cual se conoce que es llevado a cabo por un fenotipo regulador caracterizado por ser CD8⁺CD28⁻ (Najafian et al., 2003; Vuddamalay and van Meerwijk, 2017). Con ello hipotetizamos que el incremento de la población total células T CD8⁺ podía deberse a una estimulación de células de carácter regulador por el tratamiento, sin embargo, debido a la ausencia de bibliografía que establezca una relación entre la IL-37 y este tipo celular y al no haber estudiado la expresión de CD28 no podemos confirmarlo. En el humano y en el ratón también existe un tipo de células T CD8⁺ reguladoras que se caracterizan por ser CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ y tener actividad supresora. Aunque se pueden encontrar en el bazo, la presencia de estas células es tres veces mayor en las placas de Peyer y en los nódulos linfáticos mesentéricos (Churlaud et al., 2015). Para saber si se trataba de este tipo celular se determinó el porcentaje de dicha población en el bazo de los ratones tratados con IL-37, pero el número de eventos no era suficientemente representativo como para hacer una valoración fiable.

3.2.- Aproximación terapéutica con vectores inducibles codificantes de la IL-37 en el modelo de EAE

La expresión de la IL-37 tras la inducción por Dox durante la fase aguda en los animales administrados con AAV8.TetOn.IL37 no reportó diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado y el control. Los resultados clínicos e inmunológicos del tratamiento preventivo fueron evidentes cuando se incrementó la expresión hepática del transgén clonándolo bajo el control del promotor CAG. Sin embargo,

cuando el mismo transgén era expresado por el promotor CMV, no se veía efecto alguno. El promotor CAG presenta un tamaño molecular considerablemente mayor al del promotor CMV (Nguyen et al., 2008) y debido a la limitación de encapsidación que presentan los AAVs, la única opción para que todo el sistema inducible esté contenido en un único vector es la utilización de un promotor CMV. Teniendo en cuenta que el promotor inducible utilizado se trata de un híbrido de un CMV mínimo, una de las hipótesis viables es que no se estaban produciendo niveles suficientes de la proteína terapéutica como para observar un efecto clínico. Otro fenómeno que se debe tener en cuenta es la dimerización de la IL-37 a altas concentraciones, lo que disminuye considerablemente su capacidad supresora (Nold et al., 2010). Por lo que, de manera contraria a la hipótesis anterior, podría ocurrir que se esté produciendo una elevada concentración de la citoquina tanto a nivel intracelular en las células productoras como en el torrente sanguíneo, lo que llevaría a una dimerización y a una disminución de la potencia terapéutica de la citoquina. Recientemente, en un estudio por cristalografía se describieron dos mutantes de la IL-37 que eran capaces de mantenerse en forma monomérica incluso a altas concentraciones (IL-37_{D73K} e IL-37_{Y85A}) (Ellisdon et al., 2017). Teniendo en cuenta la mejora clínica observada en otro trabajo en el cual se realizó una aproximación terapéutica con IL-37 recombinante en el modelo de EAE y que además dicho efecto beneficioso era evidente incluso a bajas concentraciones de interleuquina exógena administrada (Sánchez, 2019), nos planteamos que la ausencia de efecto clínico con nuestro diseño experimental se debía a la propia estrategia de terapia génica. De manera que la utilización de mutantes monoméricos de la citoquina podría ser una solución a este problema y poder así aplicar este tratamiento mediante vectores virales.

4.- Consideraciones finales

Las citoquinas tienen funciones cruciales en el desarrollo, diferenciación y regulación de las células del sistema inmune. Como resultado, se conoce que la desregulación de la producción o acción de las diversas citoquinas tiene un papel central en el desarrollo de la autoinmunidad (O'Shea et al., 2002). En el presente trabajo se han desarrollado dos estrategias de terapia génica inmunomoduladoras con el objetivo de controlar la respuesta inflamatoria desencadenada en la EM.

En la primera parte del trabajo, se generó un receptor soluble capaz de bloquear la señalización de la IL-21 y disminuir así la respuesta pro-inflamatoria mediada por esta citoquina. El tratamiento con sIL-21R resultó efectivo tanto cuando se administraron los vectores virales antes de que se iniciase la respuesta inmune en una aproximación preventiva, como cuando se inducía la expresión una vez establecidos los primeros síntomas clínicos, en una aproximación terapéutica. Sin embargo, el posible bloqueo parcial de la citoquina durante el desarrollo de la respuesta inmune resultó contraproducente cuando el tratamiento era aplicado en una aproximación terapéutica temprana. La pleiotropicidad de la citoquina podría indicar que la IL-21 lleva a cabo funciones tanto pro- como anti-inflamatorias, de manera que en función de las señales co-estimuladoras predominantes en cada una de las fases clínicas conducirá a que el bloqueo de la citoquina resulte o no beneficioso. Es por ello que para estudios futuros sería conveniente testar el tratamiento con AAV8.TetOn.sIL21R en un modelo de EAE que desarrolle una clínica remitente-recurrente, valorando el efecto clínico al ser inducida la expresión del sIL-21R en las diferentes fases de la enfermedad al igual que la realización de un estudio inmunológico más amplio que permita esclarecer los mecanismos inmunes que predominan en cada una de las etapas al inducir el bloqueo de la IL-21. Otra estrategia terapéutica que podría resultar interesante probar en un futuro sería la co-administración de vectores inducibles portadores del sIL-21R y de un receptor soluble de la IL-6, con el objetivo de poder ejercer una inmunoregulación de la vía Th17 y favorecer la actividad supresora de las células Tregs, lo cual no se ha podido conseguir con el bloqueo de la IL-21 en monoterapia.

En la segunda parte del trabajo, se desarrolló una estrategia de sobreexpresión de la citoquina anti-inflamatoria IL-37 mediante vectores virales, obteniéndose resultados prometedores tanto a nivel clínico como inmunológico. Sin embargo, su aplicación mediante terapia génica requiere estudios adicionales con formas monoméricas de la proteína para incrementar la potencia terapéutica. Inclusive, también resultaría interesante valorar el posible efecto sinérgico del tratamiento con IL-37 y el sIL-21R, dado que la IL-37 podría ejercer una supresión de las respuestas pro-inflamatorias derivadas del bloqueo de la IL-21, como la activación de DCs, las cuales podrían estar disminuyendo la potencia terapéutica del sIL-21R.

En ambos casos desconocemos si la expresión de ambas moléculas mediante vectores virales desencadenará la generación de anticuerpos neutralizantes contra las proteínas, que acabaría generando una reducción de la eficacia terapéutica. Además, la IL-21 está implicada en respuestas anti-cancerígenas ya que entre sus funciones se encuentra la de aumentar la capacidad citotóxica de células T CD8⁺, células NK y NKT, por lo que el bloqueo de manera constitutiva de la IL-21 no sería recomendable (Santegoets et al., 2013; Davis et al., 2015; Zarkavelis et al., 2017), a parte de lo ya observado en nuestros resultados en relación a la clínica de la EAE. Por otro lado, la expresión endógena de la IL-37, en respuesta a un estímulo inflamatorio mediado por la infección de patógenos, es capaz de controlar eficientemente el proceso inflamatorio evitando que se produzca un daño tisular (Allam et al., 2020). Sin embargo, para conseguir un correcto control de la infección debe existir una regulación estricta que logre el equilibrio entre las respuestas inmunes efectoras requeridas para la eliminación de patógenos y limitar el daño tisular resultante de la inflamación excesiva para prevenir complicaciones clínicas. Por ello, una sobreexpresión constitutiva de esta citoquina podría aumentar considerablemente el riesgo de desarrollar infecciones dado que las respuestas efectoras se encontrarían basalmente inmunosuprimidas. Por todas estas razones, la realización de estudios traslacionales deberán realizarse con vectores AAVs inducibles, similares a los diseñados en el presente trabajo, que permitan inducir la expresión de las moléculas terapéuticas en la intensidad y momento necesario en función de la dosis e instante en el que se realiza la administración del inductor, prescindiendo de una expresión constitutiva que pueda desencadenar una reducción de la eficacia terapéutica y la aparición de efectos secundarios.

En definitiva, a pesar de que se precisan nuevos estudios para acabar de definir la ventana temporal terapéutica de los tratamientos con estas moléculas, se ha demostrado que ambas estrategias de terapia génica pueden suponer un avance en el panorama terapéutico actual de la EM donde la mayor cantidad de tratamientos implican el uso de anticuerpos y proteínas recombinantes.

Conclusiones

1. Se ha diseñado un receptor soluble de la IL-21 con capacidad de ejercer un bloqueo funcional efectivo de la citoquina. Con el objetivo de desarrollar una estrategia basada en terapia génica, los genes terapéuticos del sIL-21R y la IL-37 se han clonado en vectores AAVs y se ha realizado la producción, purificación y verificación de la expresión de todos ellos.
2. La administración sistémica de vectores AAVs tres semanas antes de la inmunización no produce ninguna alteración clínica, histopatológica ni en la respuesta proliferativa antígeno-específica. Sin embargo, la administración de dichos vectores cercana al momento de la inmunización reduce la severidad clínica, posiblemente debido a la generación de una respuesta inmune contra la cápside del vector en detrimento de la respuesta frente al antígeno encefalitogénico. Por ello, se han generado y validado unos vectores AAVs de expresión inducible para la realización de abordajes terapéuticos en el modelo de EAE.
3. La administración sistémica en una aproximación preventiva de AAVs portadores del sIL-21R reduce la incidencia de la enfermedad. Estas evidencias clínicas se relacionan con una mejoría histopatológica del SNC y una modificación del perfil inmunológico, siendo esta inmunomodulación apreciable a nivel sistémico durante la fase aguda. Dicha mejora clínica también se observa en el tratamiento terapéutico con vectores AAV8.TetOn.sIL21R una vez establecida la clínica de la EAE. Sin embargo, el posible bloqueo parcial de la IL-21 durante el desarrollo de la respuesta inmune durante los primeros siete días p.i produce un incremento de la severidad clínica, probablemente debido a una potenciación de la actividad pro-inflamatoria de la citoquina.
4. La administración preventiva vía sistémica de vectores AAV8.CMV.pre-IL37 y AAV8.CMV.IL37 no reporta ninguna eficacia clínica en la EAE posiblemente debido a las limitaciones asociadas a su administración mediante vectores de terapia génica. Sin embargo, el tratamiento preventivo con vectores AAV8.CAG.IL37 produce una clínica más leve durante la fase crónica de la

patología, lo cual se relaciona con una menor activación microglial en el SNC y un desarrollo de una menor respuesta tanto pro-inflamatoria como anti-inflamatoria compensatoria durante la fase aguda de la patología.

5. El tratamiento terapéutico con vectores inducibles portadores de la IL-37 no reporta ninguna mejora en la clínica establecida de la EAE, precisándose de experimentos adicionales con mutantes monoméricos que permitan optimizar la aplicación del tratamiento con esta citoquina mediante una estrategia de terapia génica.

Bibliografía

A

Abulkhir, A. *et al.* (2017) 'A protective role of IL-37 in cancer: a new hope for cancer patients', *Journal of Leukocyte Biology*, 101(2), pp. 395–406.

Albert, M. *et al.* (2007) 'Extensive cortical remyelination in patients with chronic multiple sclerosis', *Brain Pathology*, 17(2), pp. 129–138.

Allam, G. *et al.* (2020) 'The potential role of interleukin-37 in infectious diseases: Role of IL-37 in HIV-1, viral myocarditis, HCV, HBV, tuberculosis, leprosy, pneumonia, listeria, aspergillosis, candidiasis, and eumycetoma infection', *International Reviews of Immunology*, 39(1), pp. 3–10.

Allen, J. M., Halbert, C. L. and Miller, A. D. (2000) 'Improved Adeno-Associated Virus Vector Production with Transfection of a Single Helper Adenovirus Gene, E4orf6', *Molecular Therapy*, 1(1), pp. 88–95.

Alonso, A. and Hernán, M. A. (2008) 'Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: A systematic review', *Neurology*, 71(2), pp. 129–135.

Ammitzbøll, C. *et al.* (2019) 'GPR15 + T cells are Th17 like, increased in smokers and associated with multiple sclerosis', *Journal of Autoimmunity*, 97, pp. 114–121.

Anguela, X. M. and High, K. A. (2019) 'Entering the Modern Era of Gene Therapy', *Annual Review of Medicine*, 70(1), pp. 273–288.

Arnason, B. *et al.* (1999) 'TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study', *Neurology*, 53(3), pp. 457–465.

Astier, A. L. *et al.* (2006) 'Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis', *Journal of Clinical Investigation*, 116(12), pp. 3252–3257.

Aston, W. J. *et al.* (2017) 'A systematic investigation of the maximum tolerated dose of cytotoxic chemotherapy with and without supportive care in mice', *BMC Cancer*, 17(1), pp. 1–10.

Attridge, K. *et al.* (2012) 'IL-21 inhibits T cell IL-2 production and impairs Treg homeostasis', *Blood*, 119(20), pp. 4656–4664.

B

Baecher-Allan, C., Kaskow, B. J. and Weiner, H. L. (2018) 'Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy', *Neuron*, 97(4), pp. 742–768.

Baker, D. and Amor, S. (2014) 'Experimental autoimmune encephalomyelitis is a good model of multiple sclerosis if used wisely', *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 3(5), pp. 555–564.

Bar-Or, A. *et al.* (2010) 'Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS?', *Annals of Neurology*, 67(4), pp. 452–461.

Baron, B. J. L. *et al.* (1993) 'Surface expression of alpha4 Integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma', *Journal of Experimental Medicine*, 177(1), pp. 57–68.

Barr, T. A. *et al.* (2012) 'B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells', *Journal of Experimental Medicine*, 209(5), pp. 1001–1010.

Barry, M. and Bleackley, R. C. (2002) 'Cytotoxic T lymphocytes: All roads lead to death', *Nature Reviews Immunology*, 2(6), pp. 401–409.

Bartholomäus, I. *et al.* (2009) 'Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions', *Nature*, 462(7269), pp. 94–98.

Baughman, E. J. *et al.* (2011) 'Neuroantigen-specific CD8+ regulatory T-cell function is deficient during acute exacerbation of multiple sclerosis', *Journal of Autoimmunity*, 36(2), pp. 115–124.

Becklund, B. R. *et al.* (2010) 'UV radiation suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis independent of vitamin D production', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(14), pp. 6418–6423.

Berghmans, N., Dillen, C. and Heremans, H. (2006) 'Exogenous IL-12 suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by tuning IL-10 and IL-5 levels in an IFN- γ -dependent way', *Journal of Neuroimmunology*, 176(1–2), pp. 63–75.

Bettelli, E. *et al.* (2006) 'Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells', *Nature*, 441(7090), pp. 235–238.

Bhela, S. *et al.* (2015) 'Nonapoptotic and Extracellular Activity of Granzyme B Mediates Resistance to Regulatory T Cell (Treg) Suppression by HLA-DR – CD25^{hi} CD127^{lo} Tregs in Multiple Sclerosis and in Response to IL-6', *The Journal of Immunology*, 194(5), pp. 2180–2189.

Billiau, A. *et al.* (1998) 'Enhancement of experimental allergic encephalomyelitis in mice by antibodies against IFN- γ ', *Journal of Immunology*, 140(5), pp. 1506–1510.

Bomprezzi, R. (2015) 'Dimethyl fumarate in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: An overview', *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 8(1), pp. 20–30.

Brandt, K. *et al.* (2003) 'Interleukin-21 Inhibits Dendritic Cell-Mediated T Cell Activation and Induction of Contact Hypersensitivity In Vivo', *Journal of Investigative Dermatology*, 121(6), pp. 1379–1382.

Breuer, J. *et al.* (2019) 'Does the environment influence multiple sclerosis pathogenesis via UVB light and/or induction of vitamin D?', *Journal of Neuroimmunology*, 329, pp. 1–8.

Brodkey, M. B., Ben-Zacharia, A. B. and Reardon, J. D. (2002) 'Living with multiple sclerosis', *Drug Topics*, 146(14), pp. 25–31.

Bubier, J. A. *et al.* (2007) 'Treatment of BXSB-Yaa mice with IL-21R-Fc fusion protein minimally attenuates systemic lupus erythematosus', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1110, pp. 590–601.

Bufler, P. *et al.* (2004) 'Interleukin-1 homologues IL-1F7b and IL-18 contain functional mRNA instability elements within the coding region responsive to lipopolysaccharide', *Biochemical Journal*, 381(2), pp. 503–510.

Bulau, A. M. *et al.* (2014) 'Role of caspase-1 in nuclear translocation of IL-37, release of the cytokine, and IL-37 inhibition of innate immune responses', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(7), pp. 2650–2655.

C

Cavalli, G. *et al.* (2016) 'Treating experimental arthritis with the innate immune inhibitor interleukin-37 reduces joint and systemic inflammation', *Rheumatology*, 55(2), pp. 2220–2229.

Cavalli, G. and Dinarello, C. A. (2018) 'Suppression of inflammation and acquired immunity by IL-37', *Immunological Reviews*, 281(1), pp. 179–190.

Cekanaviciute, E. *et al.* (2017) 'Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(40), pp. 10713–10718.

Chanaday, N. L. and Roth, G. A. (2016) 'Microglia and astrocyte activation in the frontal cortex of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis', *Neuroscience*, 314, pp. 160–169.

Chari, D. M. (2007) 'Remyelination In Multiple Sclerosis', *International Review of Neurobiology*, 79, pp. 589–620.

Charrad, R. *et al.* (2016) 'Anti-inflammatory activity of IL-37 in asthmatic children: Correlation with inflammatory cytokines TNF- α , IL- β , IL-6 and IL-17A', *Immunobiology*, 221(2), pp. 182–187.

Chen, C. H. *et al.* (2003) 'Transforming growth factor β blocks Tec kinase phosphorylation, Ca²⁺ influx, and NFATc translocation causing inhibition of T cell differentiation', *Journal of Experimental Medicine*, 197(12), pp. 1689–1699.

Chen, H. min and Fujita, M. (2015) 'IL-37: A new player in immune tolerance', *Cytokine*, 72(1), pp. 113–114.

Chen, M. *et al.* (2009) 'Regulatory effects of IFN- β on production of osteopontin and IL-17 by CD4⁺ T Cells in MS', *European Journal of Immunology*, 39(9), pp. 2525–2536.

Cho, J. H. and Gregersen, P. K. (2011) 'Genomics and the multifactorial nature of human autoimmune disease', *New England Journal of Medicine*, 365(17), pp. 1612–1623.

Christensen, J. R. *et al.* (2013) 'Systemic Inflammation in Progressive Multiple Sclerosis Involves Follicular T-Helper, Th17- and Activated B-Cells and Correlates with Progression', *PLoS ONE*, 8(3), pp. 1–11.

Churlaud, G. *et al.* (2015) 'Human and mouse CD8+CD25+FOXP3+ regulatory T cells at steady state and during interleukin-2 therapy', *Frontiers in Immunology*, 6(171), pp. 2-11.

Clarke, L. E. and Barres, B. A. (2013) 'Emerging roles of astrocytes in neural circuit development', *Nature Reviews Neuroscience.*, 14(5), pp. 311–321.

Clough, L. E. *et al.* (2008) 'Release from Regulatory T Cell-Mediated Suppression during the Onset of Tissue-Specific Autoimmunity Is Associated with Elevated IL-21', *The Journal of Immunology*, 180(8), pp. 5393–5401.

Cohen, J. A. and Rudick, R. A. (2011). 'Multiple Sclerosis Therapeutics', *Cambridge University Press*.

Colombo, E. *et al.* (2020) 'Siponimod (BAF312) Activates Nrf2 While Hampering NF κ B in Human Astrocytes , and Protects From Neurodegeneration', *Frontiers in Immunology*, 11(635), pp. 1–11.

Compston, A. and Coles, A. (2008) 'Multiple sclerosis', *The Lancet*, 372(9648), pp. 1502–1517.

Confavreux, C. *et al.* (2014) 'Oral teriflunomide for patients with relapsing multiple sclerosis (TOWER): A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial', *The Lancet Neurology*, 13(3), pp. 247–256.

Constantinescu, C. S. *et al.* (2011) 'Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS)', *British Journal of Pharmacology*, 164(4), pp. 1079–1106.

Coquet, J. M. *et al.* (2008) 'Cutting Edge: IL-21 Is Not Essential for Th17 Differentiation or Experimental Autoimmune Encephalomyelitis', *The Journal of Immunology*, 180(11), pp. 7097-7101.

Cosorich, I. *et al.* (2017) 'High frequency of intestinal TH17 cells correlates with microbiota alterations and disease activity in multiple sclerosis', *Science Advances*, 3(7), pp. 1-9.

Craner, M. J. *et al.* (2004) 'Molecular changes in neurons in multiple sclerosis: Altered axonal expression of Nav1.2 and Nav1.6 sodium channels and Na⁺/Ca²⁺ exchanger', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(21), pp. 8168–8173.

Cross, A. H. *et al.* (2006) 'Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients', *Journal of Neuroimmunology*, 180(1-2), pp. 63–70.

Curti, E. *et al.* (2018) 'Correlation between cortical lesions and cognitive impairment in multiple sclerosis', *Brain and Behavior*, 8(6), pp. 1–8.

D

Dal Canto, M. C. *et al.* (1996) 'Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)-induced demyelination: A model for human multiple sclerosis', *Methods*, 10(3), pp. 453–461.

Davis, M. R. *et al.* (2015) 'The role of IL-21 in immunity and cancer', *Cancer Letters*, 358(2), pp. 107–114.

Dendrou, C. A., Fugger, L. and Friese, M. A. (2015) 'Immunopathology of multiple sclerosis', *Nature Reviews Immunology*, 15(9), pp. 545–558.

Deng, Y. *et al.* (2017) 'Th9 cells and IL-9 in autoimmune disorders: Pathogenesis and therapeutic potentials', *Human Immunology*, 78(2), pp. 120–128.

Derfuss, T. *et al.* (2016) 'Relapse rates in patients with multiple sclerosis treated with fingolimod: Subgroup analyses of pooled data from three phase 3 trials', *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 8, pp. 124–130.

Dinarello, C. A. *et al.* (2013) 'Interleukin-18 and IL-18 binding protein', *Frontiers in Immunology*, 4(289), pp. 1–10.

Dinarello, C. A. *et al.* (2016) 'Suppression of innate inflammation and immunity by interleukin-37', *European Journal of Immunology*, 46(5), pp. 1067–1081.

Dobson, R. and Giovannoni, G. (2019) 'Multiple sclerosis – a review', *European Journal of Neurology*, 26(1), pp. 27–40.

Domingues, H. S. *et al.* (2010) 'Functional and pathogenic differences of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis', *PLoS ONE*, 5(11), pp. 1–13.

E

Edelstein, M. (2019) *Gene Therapy Clinical Trials Worldwide*. Disponible en: <http://www.abedia.com/wiley/vectors.php> (Acceso: 22 Abril 2020).

El-Brolosy, M. A. and Stainier, D. Y. R. (2017) 'Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms', *PLoS Genetics*, 13(7), pp. 1–17.

Ellisdon, A. M. *et al.* (2017) 'Homodimerization attenuates the anti-inflammatory activity of interleukin-37', *Science Immunology*, 2(8), pp. 1–12.

Esclerosis múltiple españa (2019) *Cifras y datos de la EM*. Disponible en: <https://www.esclerosismultiple.com/dia-mundial-esclerosis-multiple-2019-cifras-reivindicaciones-actividades-programa/> (Acceso: 13 June 2020).

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

F

Falsig, J. *et al.* (2006) 'The inflammatory transcriptome of reactive murine astrocytes and implications for their innate immune function', *Journal of Neurochemistry*, 96(3), pp. 893–907.

Fan, M. Y. *et al.* (2018) 'Differential Roles of IL-2 Signaling in Developing versus Mature Tregs', *Cell Reports*, 25(5), pp. 1204–1213.

Farrokhi, M. *et al.* (2015) 'Increased serum level of IL-37 in patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica', *Acta Neurologica Belgica*, 115(4), pp. 609–614.

Feng, X. X. *et al.* (2019) 'IL-37 suppresses the sustained hepatic IFN- γ /TNF- α production and T cell-dependent liver injury', *International Immunopharmacology*, 69, pp. 184–193.

Filippi, M. *et al.* (2018) 'Multiple sclerosis', *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), pp. 1–27.

Filippini, G. *et al.* (2000) 'Corticosteroids or ACTH for acute exacerbations in multiple sclerosis', *Neurological Sciences*, 21(4), pp. 1–47.

Fitzgerald, K. C. *et al.* (2017) 'Sodium intake and multiple sclerosis activity and progression in BENEFIT', *Annals of Neurology*, 82(1), pp. 20–29.

Franchi, L. *et al.* (2009) 'The inflammasome: a caspase-1 activation platform regulating immune responses and disease pathogenesis', *Nature Immunology*, 10(3), pp. 241–247.

Franklin, R. J. M. and Ffrench-Constant, C. (2008) 'Remyelination in the CNS: From biology to therapy', *Nature Reviews Neuroscience*, 9(11), pp. 839–855.

Frischer, J. M, Weigand, S., Guo, Y., Kale, N. (2015) 'Clinical and Pathological Insights into the Dynamic Nature of the White Matter Multiple Sclerosis Plaque', *Annals of Neurology*, 78(1), pp. 710–721.

Frischer, J. M. *et al.* (2009) 'The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains', *Brain*, 132(5), pp. 1175–1189.

Fujinami, R. S. *et al.* (2006) 'Molecular Mimicry , Bystander Activation , or Viral Persistence : Infections and Autoimmune Disease', *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), pp. 80–94.

Furlan, R. *et al.* (2001) 'Intrathecal Delivery of IFN- γ Protects C57BL/6 Mice from Chronic-Progressive Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Increasing Apoptosis of Central Nervous System-Infiltrating Lymphocytes', *The Journal of Immunology*, 167(3), pp. 1821–1829.

G

Gagliani, N. *et al.* (2013) 'Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells', *Nature Medicine*, 19(6), pp. 739–746.

Gaublomme, J. T. *et al.* (2015) 'Single-Cell Genomics Unveils Critical Regulators of Th17 Cell Pathogenicity', *Cell*, 163(6), pp. 1400–1412.

Ghasemi, N., Razavi, S. and Nikzad, E. (2017) 'Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy', *Cell*, 19(1), pp. 1–10.

Ghoreschi, K. *et al.* (2010) 'Generation of pathogenic Th17 cells in the absence of TGF- β signalling', *Nature*, 467(7318), pp. 967–971.

Gilbert, K. M. *et al.* (1997) 'Transforming growth factor- β 1 induces antigen-specific unresponsiveness in naive T cells', 26(4), pp. 459–472.

Goldschmidt, T. *et al.* (2009) 'Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity', *Neurology*, 72(22), pp. 1914–1921.

Good, K. L., Bryant, V. L. and Tangye, S. G. (2006) 'Kinetics of Human B Cell Behavior and Amplification of Proliferative Responses following Stimulation with IL-21', *The Journal of Immunology*, 177(8), pp. 5236–5247.

Greter, M. *et al.* (2005) 'Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis', *Nature Medicine*, 11(3), pp. 328–334.

Grimsby, S. *et al.* (2004) 'Proteomics-based identification of proteins interacting with Smad3: SREBP-2 forms a complex with Smad3 and inhibits its transcriptional activity', *FEBS Letters*, 577(1-2), pp. 93–100.

Groux, H. *et al.* (1997) 'A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis', *Nature*, 389(6652), pp. 737–742.

Gutcher, I. *et al.* (2011) 'Autocrine transforming growth factor- β 1 promotes in vivo Th17 cell differentiation', *Immunity*, 34(3), pp. 396–408.

H

Haas, J. *et al.* (2005) 'Reduced suppressive effect of CD4+CD25^{high} regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis', *European Journal of Immunology*, 35(11), pp. 3343–3352.

Haider, L. *et al.* (2011) 'Oxidative damage in multiple sclerosis lesions', *Brain*, 134(7), pp. 1914–1924.

Hauser, S. L. *et al.* (1986) 'Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions', *Annals of Neurology*, 19(6), pp. 578–587.

Havrdová, E. *et al.* (2016) 'Activity of secukinumab, an anti-IL-17A antibody, on brain lesions in RRMS: results from a randomized, proof-of-concept study', *Journal of Neurology*, 263(7), pp. 1287–1295.

Havrdova, E., Horakova, D. and Kovarova, I. (2015) 'Alemtuzumab in the treatment of multiple sclerosis: Key clinical trial results and considerations for use', *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 8(1), pp. 31–45.

Hedström, A. K. *et al.* (2014a) 'Smokers run increased risk of developing anti-natalizumab antibodies', *Multiple Sclerosis Journal*, 20(8), pp. 1081–1085.

Hedström, A. K. *et al.* (2014b) 'Smoking and risk of treatment-induced neutralizing antibodies to interferon β -1a', *Multiple Sclerosis Journal*, 20(4), pp. 445–450.

Hedström, A. K., Olsson, T. and Alfredsson, L. (2016) 'Body mass index during adolescence, rather than childhood, is critical in determining MS risk', *Multiple Sclerosis*, 22(7), pp. 878–883.

Hemmer, B., Archelos, J. J. and Hartung, H. P. (2002) 'New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis', *Nature Reviews Neuroscience*, 3(4), pp. 291–301.

Hemmer, B., Kerschensteiner, M. and Korn, T. (2015) 'Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis', *The Lancet Neurology*, 14(4), pp. 406–419.

Heppner, F. L. *et al.* (2005) 'Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis', *Nature Medicine*, 11(2), pp. 146–152.

Heremans, H. *et al.* (1996) 'Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (CREAE) in mice: Enhancement by monoclonal antibodies against interferon- γ ', *European Journal of Immunology*, 26(10), pp. 2393–2398.

Hoffman, W. P., Ness, D. K. and Van Lier, R. B. L. (2002) 'Analysis of rodent growth data in toxicology studies', *Toxicological Sciences*, 66(2), pp. 313–319.

Hollenbach, J. A. and Oksenberg, J. R. (2015) 'The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review', *Journal of Autoimmunity*, 64, pp. 13–25.

Holmøy, T., Torkildsen, Ø. and Myhr, K. M. (2017) 'An update on cladribine for relapsing-remitting multiple sclerosis', *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 18(15), pp. 1627–1635.

van den Hoogen, W. J., Laman, J. D. and 't Hart, B. A. (2017) 'Modulation of multiple sclerosis and its animal model experimental autoimmune encephalomyelitis by food and gut microbiota', *Frontiers in Immunology*, 8(1084), pp. 1-24.

Howard, J., Trevick, S. and Younger, D. S. (2016) 'Epidemiology of Multiple Sclerosis', *Neurologic Clinics*, 34(4), pp. 919–939.

Huber, M. *et al.* (2013) 'IL-17A secretion by CD8+ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis', *Journal of Clinical Investigation*, 123(1), pp. 247–260.

I

International multiple sclerosis genetics consortium (2019) 'A systems biology approach uncovers cell-specific gene regulatory effects of genetic associations in multiple sclerosis', *Nature communications*, 10(1), pp. 1-12.

Ivanov, I. I. *et al.* (2006) 'The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells', *Cell*, 126(6), pp. 1121–1133.

Ivanov, I. I., Zhou, L. and Littman, D. R. (2007) 'Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation', *Seminars in Immunology*, 19(6), pp. 409–417.

J

Jacobsen, M. *et al.* (2002) 'Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients', *Brain*, 125(3), pp. 538–550.

Jakimovski, D. *et al.* (2018) 'Interferon β for Multiple Sclerosis', *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 8(11), pp. 1–20.

Jia, H., Liu, J. and Han, B. (2018) 'Reviews of interleukin-37: Functions, receptors, and roles in diseases', *BioMed Research International*, 2018, pp. 1-14.

Johns, L. D. *et al.* (1991) 'Successful treatment of experimental allergic encephalomyelitis with transforming growth factor-1', *Journal of Immunology*, 147(6), pp. 1792-1796.

Johns, L. D. and Sriram, S. (1993) 'Experimental allergic encephalomyelitis: Neutralizing antibody to TGF β 1 enhances the clinical severity of the disease', *Journal of Neuroimmunology*, 47(1), pp. 1–7.

Jones, S. A. and Rose-John, S. (2002) 'The role of soluble receptors in cytokine biology: The agonistic properties of the sIL-6R/IL-6 complex', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1592(3), pp. 251-263.

K

Kanter, J. L. *et al.* (2006) 'Lipid microarrays identify key mediators of autoimmune brain inflammation', *Nature Medicine*, 12(1), pp. 138–143.

Kebir, H. *et al.* (2009) 'Preferential recruitment of interferon- γ -expressing TH17 cells in multiple sclerosis', *Annals of Neurology*, 66(3), pp. 390–402.

Keeler, G. D. *et al.* (2018) 'Gene Therapy-Induced Antigen-Specific Tregs Inhibit Neuroinflammation and Reverse Disease in a Mouse Model of Multiple Sclerosis', *Molecular Therapy*, 26(1), pp. 173–183.

Kimura, A. and Kishimoto, T. (2010) 'IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance', *European Journal of Immunology*, 40(7), pp. 1830–1835.

Kivisakk, P. *et al.* (2009) 'Localizing central nervous system immune surveillance: Meningeal antigen-presenting cells activate T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis', *Annals of Neurology*, 65(4), pp. 457–469.

Kleinewietfeld, M. *et al.* (2013) 'Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic Th17 cells', *Nature*, 496(7446), pp. 518–522.

Koch-Henriksen, N. and Sørensen, P. S. (2010) 'The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology', *The Lancet Neurology*, 9(5), pp. 520–532.

Korn, T. *et al.* (2007) 'IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory Th17 cells', *Nature*, 448(7152), pp. 484–487.

Kotchev, N. M. *et al.* (2011) 'A potential role of distinctively delayed blood clearance of recombinant adeno-associated virus serotype 9 in robust cardiac transduction', *Molecular Therapy*, 19(6), pp. 1079–1089.

Kotterman, M. A., Chalberg, T. W. and Schaffer, D. V. (2015) 'Viral Vectors for Gene Therapy: Translational and Clinical Outlook', *Annual Review of Biomedical Engineering*, 17(1), pp. 63–89.

Kreiner, G. (2015) 'Compensatory mechanisms in genetic models of neurodegeneration: Are the mice better than humans?', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, pp. 1–6.

Kutzelnigg, A. *et al.* (2005) 'Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis', *Brain*, 128(11), pp. 2705–2712.

L

- Lee, Y. *et al.* (2012) 'Induction and molecular signature of pathogenic Th17 cells', *Nature Immunology*, 13(10), pp. 991–999.
- Lee, Y. *et al.* (2015) 'IL-21R signaling is critical for induction of spontaneous EAE', *The Journal of Clinical Investigation*, 6(11), pp. 4011–4020.
- Lenz, D. C., Wolf, N. A. and Swanborg, R. H. (1999) 'Strain variation in autoimmunity: Attempted tolerization of DA rats results in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis', *Journal of Immunology*, 163(4), pp. 1763–1768.
- Leray, E. *et al.* (2016) 'Epidemiology of multiple sclerosis', *Revue Neurologique*, 172(1), pp. 3–13.
- Lewis P.A and Spillane J.E (2019) '*Multiple sclerosis: The molecular and clinical pathology of neurodegenerative disease*', Academic Press.
- Li, C. and Samulski, R. J. (2020) 'Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy', *Nature Reviews Genetics*, 21(4), pp. 255–272.
- Li, R. *et al.* (2015) 'Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy', *Science Translational Medicine*, 7(310), pp. 1–10.
- Li, S. *et al.* (2015) 'Extracellular forms of IL-37 inhibit innate inflammation in vitro and in vivo but require the IL-1 family decoy receptor IL-1R8', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(8), pp. 2497–2502.
- Liu, J. *et al.* (1998) 'TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination', *Nature Medicine*, 4(1), pp. 78–83.
- Liu, R. *et al.* (2008) 'IL-21 receptor expression determines the temporal phases of experimental autoimmune encephalomyelitis', *Experimental Neurology*, 211(1), pp. 14–24.
- Long, D. *et al.* (2019) 'Clinical significance and immunobiology of IL-21 in autoimmunity', *Journal of Autoimmunity*, 99, pp. 1–14.
- Louis Jeune, V. *et al.* (2013) 'Pre-existing anti-adeno-associated virus antibodies as a challenge in AAV gene therapy', *Human Gene Therapy Methods*, 24(2), pp. 59–67.
- Lu, W. *et al.* (2016) 'Suppression of HIV replication by CD8+ regulatory T-Cells in elite controllers', *Frontiers in Immunology*, 7, pp. 2–11.
- Lublin, F. D. *et al.* (1993) 'Monoclonal anti-gamma interferon antibodies enhance experimental allergic encephalomyelitis', *Autoimmunity*, 16(4), pp. 267–274.

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

Luger, D. *et al.* (2008) 'Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: Conditions of disease induction affect dominant effector category', *Journal of Experimental Medicine*, 205(4), pp. 799–810.

Luo, Y. *et al.* (2014) 'Suppression of antigen-specific adaptive immunity by IL-37 via induction of tolerogenic dendritic cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(42), pp. 15178–15183.

M

Mack, C. L. *et al.* (2003) 'Microglia are activated to become competent antigen presenting and effector cells in the inflammatory environment of the Theiler's virus model of multiple sclerosis', *Journal of Neuroimmunology*, 144(1-2), pp. 68–79.

McLellan, A. D. and Kämpgen, E. (2000) 'Functions of myeloid and lymphoid dendritic cells', *Immunology Letters*, 72(2), pp. 101–105.

Magliozzi, R. *et al.* (2018) 'Inflammatory intrathecal profiles and cortical damage in multiple sclerosis', *Annals of Neurology*, 83(4), pp. 739–755.

Mahad, D. H., Trapp, B. D. and Lassmann, H. (2015) 'Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis', *The Lancet Neurology*, 14(2), pp. 183–193.

Makhani, N. *et al.* (2016) 'Viral exposures and MS outcome in a prospective cohort of children with acquired demyelination', *Multiple Sclerosis Journal*, 22(3), pp. 385–388.

Malmeström, C. *et al.* (2008) 'Relapses in multiple sclerosis are associated with increased CD8+ T-cell mediated cytotoxicity in CSF', *Journal of Neuroimmunology*, 196(1-2), pp. 159–165.

Malpass, K. (2012) 'Multiple sclerosis: "Outside-in" demyelination in MS', *Nature Reviews Neurology*, 8(2), pp. 61.

Maurer, M. F. *et al.* (2012) 'Generation and characterization of human anti-human IL-21 neutralizing monoclonal antibodies', *mAbs*, 4(1), pp. 69–83.

McCoy, L., Tsunoda, I. and Fujinami, R. S. (2006) 'Multiple sclerosis and virus induced immune responses: Autoimmunity can be primed by molecular mimicry and augmented by bystander activation', *Autoimmunity*, 39(1), pp. 9–19.

McCurdy, S. *et al.* (2017) 'Macrophage-Specific Expression of IL-37 in Hyperlipidemic Mice Attenuates Atherosclerosis', *The Journal of Immunology*, 199(10), pp. 3604–3613.

- McDonald, W. I. *et al.* (2001) 'Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis', *Annals of Neurology*, 50(1), pp. 121–127.
- McGuire, H. M. *et al.* (2011) 'Interleukin-21 is critically required in autoimmune and allogeneic responses to islet tissue in murine models', *Diabetes*, 60(3), pp. 867–875.
- McNamee, E. N. *et al.* (2011) 'Interleukin 37 expression protects mice from colitis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(40), pp. 16711–16716.
- Mehta, D. S. *et al.* (2003) 'IL-21 Induces the Apoptosis of Resting and Activated Primary B Cells', *The Journal of Immunology*, 170(8), pp. 4111–4118.
- Meliani, A. *et al.* (2018) 'Antigen-selective modulation of AAV immunogenicity with tolerogenic rapamycin nanoparticles enables successful vector re-administration', *Nature Communications*, 9(1), pp. 1-13.
- Mencin, A., Kluwe, J. and Schwabe, R. F. (2009) 'Toll-like receptors as targets in chronic liver diseases', *Gut*, 58(5), pp. 704–720.
- Miao, C. *et al.* (1998) 'The kinetics of rAAV integration in the liver', *Nature Genetics*, 19(3), pp. 13–15.
- Mingozzi, F. *et al.* (2007) 'CD18+ T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans', *Nature Medicine*, 13(4), pp. 419–422.
- Mingozzi, F. and High, K. A. (2013) 'Immune responses to AAV vectors: Overcoming barriers to successful gene therapy', *Blood*, 122(1), pp. 23–36.
- Miralles, M. *et al.* (2017) 'Clinical and Histopathological Amelioration of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by AAV Vectors Expressing a Soluble Interleukin-23 Receptor', *Neurotherapeutics*, 14(4), pp. 1095–1106.
- Miron, V. E. *et al.* (2013) 'M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination', *Nature Neuroscience*, 16(9), pp. 1211–1218.
- Miyake, S. *et al.* (2015) 'Dysbiosis in the gut microbiota of patients with multiple sclerosis, with a striking depletion of species belonging to clostridia XIVa and IV clusters', *PLoS ONE*, 10(9), pp. 1-16.
- Montalban, X. *et al.* (2017) 'Ocrelizumab versus placebo in primary progressive multiple sclerosis', *New England Journal of Medicine*, 376(3), pp. 209–220.
- Moreno, B. *et al.* (2012) 'Guía de uso adecuado de modelos animales para el desarrollo de terapias en esclerosis múltiple', *Revista de Neurología*, 54(2), pp. 114–124.

Moretti, S. *et al.* (2014) 'IL-37 Inhibits Inflammasome Activation and Disease Severity in Murine Aspergillosis', *PLoS Pathogens*, 10(11), pp. 1-13.

Mosser, D. M. and Edwards, J. P. (2008) 'Exploring the full spectrum of macrophage activation', *Nature Reviews Immunology*, 8(12), pp. 958–969.

Moullan, N. *et al.* (2015) 'Tetracyclines disturb mitochondrial function across eukaryotic models: A call for caution in biomedical research', *Cell Reports*, 10(10), pp. 1681–1691.

MS international federation (2014) *Atlas of MS 2013: mapping multiple sclerosis around the world*. Disponible en: <https://www.msif.org/wp-content/uploads/2014/09/Atlas-of-MS.pdf> (Acceso: 13 March 2020).

N

Najafian, J. *et al.* (2019) 'Late Cardiotoxicity in MS Patients Treated with Mitoxantrone', *International Journal of Preventive Medicine*, 10(211), pp. 1–4.

Najafian, N. *et al.* (2003) 'Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model', *Journal of Clinical Investigation*, 112(7), pp. 1037–1048.

Nakanishi, K. *et al.* (2001) 'Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu', *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 12(1), pp. 53-72.

National multiple sclerosis society (2020) *MS symptoms*. Disponible en: <https://www.nationalmssociety.org/Symptoms-Diagnosis/MS-Symptoms> (Acceso: 16 Marzo 2020).

Nguyen, A. T. *et al.* (2008) 'Evaluation of Gene Promoters for Liver Expression by Hydrodynamic Gene Transfer', *Journal of Surgical Research*, 148(1), pp. 60–66.

Nohra, R. *et al.* (2010) 'RGMA and IL21R show association with experimental inflammation and multiple sclerosis', *Genes and Immunity*, 11(4), pp. 279–293.

Nold-Petry, C. A. *et al.* (2015) 'IL-37 requires the receptors IL-18R α and IL-1R8 (SIGIRR) to carry out its multifaceted anti-inflammatory program upon innate signal transduction', *Nature Immunology*, 16(4), pp. 354–365.

Nold, M. F. *et al.* (2010) 'IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity', *Nature Immunology*, 11(11), pp. 1014–1022.

Nurieva, R. *et al.* (2007) 'Essential Autocrine Regulation by IL-21 in the Generation of Inflammatory T Cells', *Nature*, 448(7152), pp. 480-483.

O

O'Connor, R. A., Malpass, K. H. and Anderton, S. M. (2007) 'The Inflamed Central Nervous System Drives the Activation and Rapid Proliferation of Foxp3 + Regulatory T Cells', *The Journal of Immunology*, 179(2), pp. 958–966.

O'Shea, J. J., Ma, A. and Lipsky, P. (2002) 'Cytokines and autoimmunity', *Nature Reviews Immunology*, 2(1), pp. 37–45.

P

Pan, G. *et al.* (2001) 'IL-1H, an interleukin 1-related protein that binds IL-18 receptor/IL-1Rrp', *Cytokine*, 13(1), pp. 1–7.

Pan, Y. *et al.* (2020) 'The role of IL-37 in skin and connective tissue diseases', *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 122, pp. 1-10.

Panitch, H. S. *et al.* (1987) 'Exacerbations of Multiple Sclerosis in Patients Treated With Gamma Interferon', *The Lancet*, 329(8538), pp. 893–895.

Petry, H. *et al.* (2008) 'Effect of viral dose on neutralizing antibody response and transgene expression after AAV1 vector re-administration in mice', *Gene Therapy*, 15(1), pp. 54–60.

Piao, W. H. *et al.* (2008) 'IL-21 modulates CD4+ CD25+ regulatory T-cell homeostasis in experimental autoimmune encephalomyelitis', *Scandinavian Journal of Immunology*, 67(1), pp. 37–46.

Piedra, J. *et al.* (2015) 'Development of a rapid, robust and universal picogreen-based method to titrate adeno-associated vectors', *Human Gene Therapy Methods*, 26(1), pp. 35–42.

Polman, C. H. *et al.* (2006) 'A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis', *The New England Journal of Medicine*, 354(9), pp. 899–910.

Polman, C. H. *et al.* (2011) 'Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria', *Annals of Neurology*, 69(2), pp. 292–302.

Popescu, B., Pirko, I., Lucchinetti, C. (2013) 'Pathology of Multiple Sclerosis: Where Do We Stand?', *Continuum*, 19(4), pp. 901–921.

Procaccini, C. *et al.* (2015) 'Animal models of Multiple Sclerosis', *European Journal of Pharmacology*, 759, pp. 182–191.

Poser, C. M. *et al.* (1983) 'New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols.', *Annals of neurology*, 13(3), pp. 227–231.

Q

Quintana, F. J. *et al.* (2012) 'Antigen microarrays identify CNS-produced autoantibodies in RRMS', *Neurology*, 78(8), pp. 532–539.

R

Racke, M. K. *et al.* (1991) 'Prevention and treatment of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis by transforming growth factor-1', *Journal of Immunology*, 146(9), pp. 3012-3017.

Ransohoff, R. M. and Engelhardt, B. (2012) 'The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system', *Nature Reviews Immunology*, 12(9), pp. 623–635.

Rieckmann, P. *et al.* (2008) 'Escalating immunotherapy of multiple sclerosis', *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 1(3), pp. 181–192.

Rivers, T. and Schwentker, M. (1935) 'Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys', *Journal of Experimental Medicine*, 61(5), pp. 689–702.

Robinson, A. P. *et al.* (2014) 'The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS. utility for understanding disease pathophysiology and treatment', *Handbook of Clinical Neurology*, 122, pp. 173-189.

Roeleveld, D. M. *et al.* (2017) 'Higher efficacy of anti-IL-6/IL-21 combination therapy compared to monotherapy in the induction phase of Th17-driven experimental arthritis', *PLoS ONE*, 12(2), pp. 1–16.

Rogers, G. L. *et al.* (2011) 'Innate immune responses to AAV vectors', *Frontiers in Microbiology*, 2(194), pp. 1–10.

Rosati, G. (2001) 'The prevalence of multiple sclerosis in the world: An update', *Neurological Sciences*, 22(2), pp. 117–139.

Rosenblum, M. D., Remedios, K. A. and Abbas, A. K. (2015) 'Mechanisms of human autoimmunity', *Journal of Clinical Investigation*, 125(6), pp. 2228–2233.

S

Sánchez, A. (2019) '*Novel experimental strategies to treat multiple sclerosis*' (Tesis doctoral). Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España.

Sands, M. (2011) 'AAV-mediated liver-directed gene therapy', *Gene Therapy*, 807, pp. 141–157.

- Santegoets, S. J. *et al.* (2013) 'IL-21 in cancer immunotherapy At the right place at the right time', *Oncoimmunology*, 2(6), pp. 1-4.
- Sawcer, S., Franklin, R. J. and Ban, M. (2014) 'Multiple sclerosis genetics', *The Lancet Neurology*, 13(7), pp. 700–709.
- Schirmer, L., Srivastava, R. and Hemmer, B. (2014) 'To look for a needle in a haystack: The search for autoantibodies in multiple sclerosis', *Multiple Sclerosis Journal*, 20(3), pp. 271–279.
- Schmidt, S. *et al.* (1997) 'Multiple sclerosis: Comparison of the human T-cell response to S100 β and myelin basic protein reveals parallels to rat experimental autoimmune panencephalitis', *Brain*, 120(8), pp. 1437–1445.
- Schmidt, S. (1999) 'Candidate autoantigens in multiple sclerosis', *Multiple Sclerosis*, 5(3), pp. 147–160.
- Schmitt, C., Strazielle, N. and Gherzi-Egea, J. F. (2012) 'Brain leukocyte infiltration initiated by peripheral inflammation or experimental autoimmune encephalomyelitis occurs through pathways connected to the CSF-filled compartments of the forebrain and midbrain', *Journal of Neuroinflammation*, 9, pp. 1–15.
- Schneider, A. *et al.* (2013) 'In active relapsing-remitting multiple sclerosis, effector T cell resistance to adaptive Tregs involves IL-6-mediated signaling', *Science Translational Medicine*, 5(170), pp. 1-8.
- Schreiber, T. H. *et al.* (2007) 'Shear flow-dependent integration of apical and subendothelial chemokines in T-cell transmigration: Implications for locomotion and the multistep paradigm', *Blood*, 109(4), pp. 1381–1386.
- Scott, L. J. (2013) 'Glatiramer acetate: A review of its use in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis and in delaying the onset of clinically definite multiple sclerosis', *CNS Drugs*, 27(11), pp. 971–988.
- Sehat, M. *et al.* (2018) 'Evaluating Serum Levels of IL-33, IL-36, IL-37 and Gene Expression of IL-37 in Patients with Psoriasis Vulgaris', *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, 17(2), pp. 179–187.
- Selmaj, K., Raine, C. S. and Cross, A. H. (1991) 'Anti—tumor necrosis factor therapy abrogates autoimmune demyelination', *Annals of Neurology*, 30(5), pp. 694–700.
- Sharaf, N., Nicklin, M. J. and Di Giovine, F. S. (2014) 'Long-range DNA interactions at the IL-1/IL-36/IL-37 gene cluster (2q13) are induced by activation of monocytes', *Cytokine*, 68(1), pp. 16–22.
- Shuai, X. *et al.* (2015) 'Expression of IL-37 contributes to the immunosuppressive property of human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells', *Scientific Reports*, 5(14478), pp. 1-10.

Skak, K., Frederiksen, K. S. and Lundsgaard, D. (2008) 'Interleukin-21 activates human natural killer cells and modulates their surface receptor expression', *Immunology*, 123(4), pp. 575–583.

Smith, R. H. (2008) 'Adeno-associated virus integration: Virus versus vector', *Gene Therapy*, 15(11), pp. 817–822.

Sonar, S. A. and Lal, G. (2017) 'Differentiation and transmigration of CD4 T cells in neuroinflammation and autoimmunity', *Frontiers in Immunology*, 8, pp. 1–9.

Song, L. *et al.* (2013) 'Glucocorticoid regulates interleukin-37 in systemic lupus erythematosus', *Journal of Clinical Immunology*, 33(1), pp. 111–117.

Songster, C. *et al.* (2011). 'Visual evoked potentials for the diagnosis of multiple sclerosis: limitations early in the course of the disease', *Neurology*, 76, pp. 223-224.

Sospedra, M. and Martin, R. (2006) 'Molecular mimicry in multiple sclerosis', *Autoimmunity*, 39(1), pp. 3–8.

Sospedra, M. and Martin, R. (2016) 'Immunology of Multiple Sclerosis', *Seminars in Neurology*, 36(2), pp. 115–127.

Spolski, R. and Leonard, W. J. (2008) 'Interleukin-21: Basic Biology and Implications for Cancer and Autoimmunity', *Annual Review of Immunology*, 26(1), pp. 57–79.

Spolski, R. and Leonard, W. J. (2014) 'Interleukin-21: A double-edged sword with therapeutic potential', *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(5), pp. 379–395.

Srivastava, R. *et al.* (2012) 'Potassium channel KIR4.1 as an immune target in multiple sclerosis', *New England Journal of Medicine*, 367(2), pp. 115–123.

Stahnke, A. M. and Holt, K. M. (2018) 'Ocrelizumab: A New B-cell Therapy for Relapsing Remitting and Primary Progressive Multiple Sclerosis', *Annals of Pharmacotherapy*, 52(5), pp. 473–483.

Stepaniak, J. A. *et al.* (1997) 'Interstrain variability of autoimmune encephalomyelitis in rats: Multiple encephalitogenic myelin basic protein epitopes for DA rats', *Journal of Neuroimmunology*, 78(1–2), pp. 79–85.

Strengell, M. *et al.* (2006) 'IL-21 enhances SOCS gene expression and inhibits LPS-induced cytokine production in human monocyte-derived dendritic cells', *Journal of Leukocyte Biology*, 79(6), pp. 1279–1285.

Sun, Q. *et al.* (2013) 'Caspase-1 activation is protective against hepatocyte cell death by up-regulating beclin 1 protein and mitochondrial autophagy in the setting of redox stress', *Journal of Biological Chemistry*, 288(22), pp. 15947–15958.

Sundqvist, E. *et al.* (2014) 'Cytomegalovirus seropositivity is negatively associated with multiple sclerosis', *Multiple Sclerosis*, 20(2), pp. 165–173.

Sundström, P. *et al.* (2009) 'Antibodies to specific EBNA-1 domains and HLA DRB1*1501 interact as risk factors for multiple sclerosis', *Journal of Neuroimmunology*, 215(1–2), pp. 102–107.

T

Tada, T. *et al.* (1978) 'Two distinct types of helper T cells involved in the secondary antibody response: independent and synergistic effects of Ia⁻ and Ia⁺ helper T cells', *The Journal of Experimental Medicine*, 147(2), pp. 446–458.

Tegla, C. A. *et al.* (2013) 'Dual role of Response gene to complement-32 in multiple sclerosis', *Experimental and Molecular Pathology*, 94(1), pp. 17–28.

Tennakoon, D. K. *et al.* (2006) 'Therapeutic Induction of Regulatory, Cytotoxic CD8 + T Cells in Multiple Sclerosis', *The Journal of Immunology*, 176(11), pp. 7119–7129.

Teuscher, C., Hickey, W. F. and Korngold, R. (1990) 'An analysis of the role of tumor necrosis factor in the phenotypic expression of actively induced experimental allergic orchitis and experimental allergic encephalomyelitis', *Clinical Immunology and Immunopathology*, 54(3), pp. 442–453.

Thomas, C. E., Ehrhardt, A. and Kay, M. A. (2003) 'Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy', *Nature Reviews Genetics*, 4(5), pp. 346–358.

Thompson, A. J. *et al.* (2018) 'Multiple sclerosis', *The Lancet*, 391(10130), pp. 1622–1636.

Toft-Hansen, H., Füchtbauer, L. and Owens, T. (2011) 'Inhibition of reactive astrocytosis in established experimental autoimmune encephalomyelitis favors infiltration by myeloid cells over T cells and enhances severity of disease', *Glia*, 59(1), pp. 166–176.

Trapp, B. D. and Nave, K. A. (2008) 'Multiple Sclerosis: An Immune or Neurodegenerative Disorder?', *Annual Review of Neuroscience*, 31(1), pp. 247–269.

Traugott, U., Reinherz, E. L. and Raine, C. S. (1983) 'Multiple sclerosis. Distribution of T cells, T cell subsets and Ia-positive macrophages in lesions of different ages', *Journal of Neuroimmunology*, 4(3), pp. 201–221.

Tsutsumi, N. *et al.* (2014) 'The structural basis for receptor recognition of human interleukin-18', *Nature Communications*, 5, pp. 1–13.

Tzartos, J. S. *et al.* (2011) 'IL-21 and IL-21 receptor expression in lymphocytes and neurons in multiple sclerosis brain', *American Journal of Pathology*, 178(2), pp. 794–802.

V

Van Oosten, B. W. *et al.* (1996) 'Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2', *Neurology*, 47(6), pp. 1531–1534.

Vanrell, L. *et al.* (2011) 'Development of a liver-specific tet-on inducible system for AAV vectors and its application in the treatment of liver cancer', *Molecular Therapy*, 19(7), pp. 1245–1253.

Vollmer, T. L. *et al.* (2005) 'Differential Effects of IL-21 during Initiation and Progression of Autoimmunity against Neuroantigen', *The Journal of Immunology*, 174(5), pp. 2696–2701.

Vuddamalay, Y. and van Meerwijk, J. P. M. (2017) 'CD28- and CD28^{low}CD8⁺ regulatory T cells: Of mice and men', *Frontiers in Immunology*, 8(31), pp. 1–7.

W

Waldner, H., Collins, M. and Kuchroo, V. K. (2004) 'Activation of antigen-presenting cells by microbial products breaks self tolerance and induces autoimmune disease', *Journal of Clinical Investigation*, 113(7), pp. 990–997.

Wang, D., Tai, P. W. L. and Gao, G. (2019) 'Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery', *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(5), pp. 358–378.

Wang, D. W. *et al.* (2016) 'Interleukin-37 Enhances the Suppressive Activity of Naturally Occurring CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells', *Scientific Reports*, 6, pp. 1–11.

Wang, L., Wang, F. S. and Gershwin, M. E. (2015) 'Human autoimmune diseases: A comprehensive update', *Journal of Internal Medicine*, 278(4), pp. 369–395.

Warnke, C. *et al.* (2010) 'Natalizumab and progressive multifocal leucoencephalopathy', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 67(8), pp. 923–930.

Wei, L. *et al.* (2007) 'IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner', *Journal of Biological Chemistry*, 282(48), pp. 34605–34610.

Wilkinson, D. S. *et al.* (2017) 'Partial CD25 Antagonism Enables Dominance of Antigen-Inducible CD25^{high} FOXP3⁺ Regulatory T Cells As a Basis for a Regulatory T Cell- Based Adoptive Immunotherapy', *Frontiers in Immunology*, 8(1782), pp. 1–21.

Windhagen, A. *et al.* (1995) 'Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), and interleukin 12 cytokine in multiple sclerosis lesions', *Journal of Experimental Medicine*, 182(6), pp. 1985–1996.

Woodruff, R. H. and Franklin, R. J. M. (1999) 'Demyelination and remyelination of the caudal cerebellar peduncle of adult rats following stereotaxic injections of lysolecithin, ethidium bromide, and complement/anti-galactocerebroside: A comparative study', *Glia*, 25(3), pp. 216-228.

X

Xiao, X., Li, J. and Samulski, R. J. (1998) 'Production of High-Titer Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors in the Absence of Helper Adenovirus', *Journal of Virology*, 72(3), pp. 2224-2232.

Xu, W. *et al.* (2005) 'Mechanism of natural killer (NK) cell regulatory role in experimental autoimmune encephalomyelitis', *Journal of Neuroimmunology*, 163(1-2), pp. 24-30.

Y

Ye, L. *et al.* (2015) 'IL-37 Alleviates Rheumatoid Arthritis by Suppressing IL-17 and IL-17-Triggering Cytokine Production and Limiting Th17 Cell Proliferation', *The Journal of Immunology*, 194(11), pp. 5110-5119.

Yi, W., Schlüter, D. and Wang, X. (2019) 'Astrocytes in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis: Star-shaped cells illuminating the darkness of CNS autoimmunity', *Brain, Behavior, and Immunity*, 80, pp. 10-24.

Yoshizaki, A. *et al.* (2012) 'Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions', *Nature*, 491(7423), pp. 264-268.

Young, D. A. *et al.* (2007) 'Blockade of the interleukin-21/interleukin-21 receptor pathway ameliorates disease in animal models of rheumatoid arthritis', *Arthritis and Rheumatism*, 56(4), pp. 1152-1163.

Yu, R. Y. and Gallagher, G. (2010) 'A Naturally Occurring, Soluble Antagonist of Human IL-23 Inhibits the Development and In Vitro Function of Human Th17 Cells', *The Journal of Immunology*, 185(12), pp. 7302-7308.

Yuan, Z. C. *et al.* (2019) 'Elevated expression of interleukin-37 in patients with rheumatoid arthritis', *International Journal of Rheumatic Diseases*, 22(6), pp. 1123-1129.

Z

Zabala, M. *et al.* (2004) 'Optimization of the Tet-on System to Regulate Interleukin 12 Expression in the Liver for the Treatment of Hepatic Tumors', *Cancer Research*, 64(8), pp. 2799-2804.

Zarkavelis, G., Kefas, A. and Pentheroudakis, G. (2017) 'The emerging role of Interleukin-21 as an antineoplastic immunomodulatory treatment option', *Translational Cancer Research*, 6(Suppl 2), pp. S328–S330.

Zeng, R. *et al.* (2005) 'Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8⁺ T cell expansion and function', *Journal of Experimental Medicine*, 201(1), pp. 139–148.

Zhang, X. *et al.* (2013) 'Differential Reconstitution of T Cell Subsets following Immunodepleting Treatment with Alemtuzumab (Anti-CD52 Monoclonal Antibody) in Patients with Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis', *The Journal of Immunology*, 191(12), pp. 5867–5874.

Zhu, M. *et al.* (2013) 'pSTAT3: A target biomarker to study the pharmacology of the anti-IL-21R antibody ATR-107 in human whole blood', *Journal of Translational Medicine*, 11(1), pp. 1–9.

Zielinski, C. E. *et al.* (2012) 'Pathogen-induced human T H17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β ', *Nature*, 484(7395), pp. 514–518.

Zincarelli, C. *et al.* (2008) 'Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection', *Molecular Therapy*. The American Society of Gene Therapy, 16(6), pp. 1073–1080.

Zotos, D. *et al.* (2010) 'IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism', *Journal of Experimental Medicine*, 207(2), pp. 365–378.

Zozulya, A. L. and Wiendl, H. (2008) 'The role of regulatory T cells in multiple sclerosis', *Nature Clinical Practice Neurology*, 4(7), pp. 384–398.

Zrzavy, T. *et al.* (2017) 'Loss of "homeostatic" microglia and patterns of their activation in active multiple sclerosis', *Brain*, 140(7), pp. 1900–1913.

Anexo

1.- Vectores plasmídicos y virales generados

1.1.- Vectores plasmídicos

| Vectores constitutivos del sIL-21R |
|---|
| p600.CMV.sIL21R |
| pKP1.4.CMV.sIL21R |
| pGV.CMV.sIL21R |
| pAAV.CAG.sIL21R |
| Vectores constitutivos de la IL-37 |
| pGV.CMV.preIL37 |
| pGV.CMV.IL37 |
| pAAV.CAG.IL37 |
| Vectores inducibles |
| pGV.TetOn |
| pGV.TetOn.sIL21R |
| pGV.TetOn.IL37 |

pGV: plásmido para la producción de AAVs con promotor CMV.

pAAV.CAG: plásmido para la producción de AAVs con promotor CAG.

pGV.TetOn: plásmido para la producción de AAVs con promotor inducible por Dox.

pKP1.4: plásmido que contiene el genoma del Ad5 para su producción.

1.2.- Vectores virales

| Vectores adenovirales |
|--------------------------------|
| Ad5.CMV.GFP |
| Ad5.CMV.sIL21R |
| Vectores adenoasociados |
| AAV8.CMV.Null |
| AAV8.CAG.Null |
| AAV8.TetOn.Null |
| AAV8.TetOn.eGFP |
| AAV8.CMV.sIL21R |
| AAV8.CAG.sIL21R |
| AAV8.TetOn.sIL21R |
| AAV8.CMV.preIL37 |
| AAV8.CMV.IL37 |
| AAV8.CAG.IL37 |
| AAV8.TetOn.IL37 |

2.- Oligos utilizados para qPCR

2.1.- Oligos para estudios de expresión de transgenes

| Transgén | Oligo directo | Oligo reverso |
|-----------------------|------------------------------|------------------------------|
| CMV / TetOn sIL21R | 5' CTCAGCCAGGCACTTCATTC 3' | 5' CTCGAAGCATTAAACCCTCACT 3' |
| CAG.sIL21R | 5' CGTCATCTTTCAGACCCAGGC 3' | 5' GCAGCGTATCCACATAGCG 3' |
| CMV / TetOn IL37 | 5' GCAATTGTAATGAGCCTGTTGG 3' | 5' CTCGAAGCATTAAACCCTCACT 3' |
| CAG.IL37 | 5' CCCAGTGAGGTCAGCGATTAG 3' | 5' GCAGCGTATCCACATAGCG 3' |
| Gapdh | 5' AGGTCGGTGTGAACGGATTTG 3' | 5' TGTAGACCATGTAGTTGAGGTC 3' |

2.2.- Sondas Taqman para estudios de poblaciones inmunes y citoquinas

2.2.1.- Sondas TaqMan inventariadas

| Gen | Identificador | Referencia | Casa comercial |
|--------|---------------|------------|----------------|
| Gata-3 | Mm00484683_m1 | 4331182 | Invitrogen |
| Foxp3 | Mm00475162_m1 | 4331182 | Invitrogen |
| Tbx21 | Mm00450960_m1 | 4331182 | Invitrogen |
| IL4 | Mm00445259_m1 | 4453320 | Invitrogen |
| IL10 | Mm01288386_m1 | 4453320 | Invitrogen |
| IFNg | Mm01168134_m1 | 4453320 | Invitrogen |
| IL17A | Mm00439618_m1 | 4453320 | Invitrogen |
| TGFb1 | Mm01178820_m1 | 4453320 | Invitrogen |
| Gapdh | Mm99999915_m1 | 4453320 | Invitrogen |

Fluoróforo: FAM; quencher: MGB

2.2.2.- Sonda TaqMan Rorc2 custom

| Gen | Oligos | Sonda | Referencia |
|-------|---|--|------------|
| Rorc2 | (Directo) 5' CCGCTGAGAGGGCTTCAC 3' (Reverso) 5' TGCAGGAGTAGCCACATTACA 5' | 5' FAM- AAGGGTTCTCCGCCGAG CCAGCAG-TAMRA 3' | 4331348 |

Secuencias obtenidas de (Ivanov et al., 2006). Casa comercial: Invitrogen.

3.- Anticuerpos utilizados en citometría de flujo

| Panel | Anticuerpo | Fluorocromo | Referencia | Casa comercial |
|---|----------------|-------------|------------|----------------|
| Común | CD16/32 | | 553142 | BD Pharmigen |
| 1.- Células Tregs | CD3 ϵ | FITC | 561827 | BD Pharmigen |
| | CD4 | APC-H7 | 12-0251 | eBiosciences |
| | CD8a | BV605 | 563152 | BD Horizon |
| | CD25 | PE | 12-0251 | eBiosciences |
| | Foxp3 | APC | 17-5773 | eBiosciences |
| | FVS | eF450 | 562247 | BD Horizon |
| 2.- Células T productoras de citoquinas pro-inflamatorias | CD3 ϵ | FITC | 561827 | BD Pharmigen |
| | CD4 | PerCP-eF710 | 46-0042 | eBiosciences |
| | CD8a | BV605 | 563152 | BD Horizon |
| | CD69 | APC | 560689 | BD Pharmigen |
| | IL-17A | PE | 561020 | BD Pharmigen |
| | IFN γ | BV421 | 563376 | BD Horizon |
| | FVS | V510 | 564406 | BD Horizon |
| 3.- Células T productoras de citoquinas anti-inflamatorias | CD3 ϵ | FITC | 561827 | BD Pharmigen |
| | CD4 | PerCP-eF710 | 46-0042 | eBiosciences |
| | CD8a | BV605 | 563152 | BD Horizon |
| | IL-4 | APC | 554436 | BD Pharmigen |
| | IL-10 | BV421 | 563276 | BD Horizon |
| | FVS | V510 | 564406 | BD Horizon |
| 4.- Células B | CD3 ϵ | FITC | 561827 | BD Pharmigen |
| | CD1d | PE | 553846 | BD Pharmigen |
| | MHCII | PerCP-Cy5.5 | 562363 | BD Pharmigen |
| | B220 | PE-Cy7 | 552772 | BD Pharmigen |
| | CD5 | APC | 550035 | BD Pharmigen |
| | CD19 | APC-H7 | 560143 | BD Pharmigen |
| | CD138 | BV421 | 562610 | BD Horizon |
| | FVS | V510 | 564406 | BD Horizon |
| 5.- Activación de DCs | B220 | FITC | 553088 | BD Pharmigen |
| | CD80 | PE | 553769 | BD Pharmigen |
| | MHCII | PerCP-Cy5.5 | 562363 | BD Pharmigen |
| | CD11b | PE-Cy7 | 25-0112 | eBiosciences |
| | CD11c | APC-eF780 | 47-0114 | eBiosciences |
| | CD86 | BV510 | 563077 | BD Pharmigen |
| | CD8a | BV605 | 563152 | BD Horizon |
| | FVS | eF450 | 562247 | BD Horizon |

| | | | | |
|-----------------------|----------------|--------|--------|--------------|
| 6.- Macrófagos | Ly6G | FITC | 551460 | BD Pharmigen |
| | F4/80 | PE | 565410 | BD Pharmigen |
| | Ly6C | PE-Cy7 | 560593 | BD Pharmigen |
| | CD206 | AF647 | 141712 | BioLegend |
| | CD11b | BV421 | 562605 | BD Horizon |
| | FVS | V510 | 564406 | BD Horizon |
| 7.- Células NK | CD3 ϵ | FITC | 561827 | BD Pharmigen |
| | CD69 | APC | 560689 | BD Pharmigen |
| | NK1.1 | BV605 | 563220 | BD Horizon |
| | FVS | eF450 | 562247 | BD Horizon |

FVS: marcador de viabilidad