



UNIVERSITAT DE BARCELONA



FACULTAT DE FARMÀCIA

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

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

Herena Eixarch Ahufinger  
2008





FACULTAT DE FARMÀCIA  
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
Programa de doctorado de Biomedicina  
Bienio 2000-2002

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

Memoria presentada por Herena Eixarch Ahufinger para optar al título de doctor  
por la Universitat de Barcelona

Director de la tesis doctoral: Dr. Jordi Barquintero Máñez

Doctoranda: Herena Eixarch Ahufinger

Tutor: Dr. Carlos J. Ciudad Gómez

Herena Eixarch Ahufinger  
2008



***“I want to know God’s  
thoughts, the rest are  
details.”***

***Albert Einstein***



## **AGRADECIMIENTOS**

Mi principal agradecimiento va dirigido a Jordi Barquinero, director de esta tesis doctoral, un jefe con una gran calidad humana y con grandes ideas científicas. Por la confianza que siempre ha depositado en mi y por haberme brindado la oportunidad de gozar de la investigación. También quiero agradecerle su optimismo, que nos ha ayudado a sobrellevar los momentos difíciles.

A Carmen Espejo, una excelente investigadora con la que a lo largo de todos estos años de trabajo conjunto hemos cosechado una excelente relación personal, y con la que espero continuar colaborando en el futuro. Sin ella este trabajo no se hubiera podido realizar.

A Francisco Vidal, que ha contribuido en este trabajo en el diseño de los vectores y otros procedimientos de biología molecular. Por estar siempre dispuesto a solucionar las dudas de molecular y soportar estoicamente la calamidad de nuestros conocimientos informáticos.

A Dominique Gallardo, por transmitirme sus conocimientos de biología molecular y por los buenos momentos de “convivencia” pasados en el laboratorio.

A Ramón Gimeno, cuyos consejos sobre inmunología han sido y continúan siendo muy valiosos.

A Xavier Montalban, director de la *Unitat de Neuroimmunologia Clínica*, por creer en este proyecto y por todos los años que llevamos colaborando.

A Marco Prinz y a Alexander Mildner, cuya colaboración ha sido importante para esta tesis.

A Marta Rosal, veterinaria del estabulario, así como al resto de personal de este servicio, por la ayuda prestada en tantísimas ocasiones.

A Ricardo Pujol Borrell y Dolores Jaraquemada por los consejos recibidos al inicio del proyecto.

A Ana Limón, una apasionada de la investigación con la que fue un placer trabajar y a la que agradezco todo lo que aprendí de ella.

A Alba Gómez por ayudarme en los experimentos de la última etapa de este trabajo y a la que deseo lo mejor para su tesis doctoral.

A Elisabeth Kádár, Mónica George y Núria Martínez, que en su etapa en el laboratorio contribuyeron a los trabajos que se presentan en esta tesis.

A mis actuales compañeras y compañero de laboratorio: Sónia, Eva, Eli, Elisenda, Rebeca, Irene, Luís y Melanie (aunque ya no esté en el laboratorio) por las comilonas y los momentos tan buenos que pasamos juntos.

A Elisenda Farssac, Marta G.Escarp, Lorena Ramírez y Jorge Sánchez, con los que además de haber compartido muchas horas de laboratorio, me une una estrecha amistad.

*Al Banc de Sang i Teixits y al Institut de Recerca de l'HUVH por el apoyo recibido y por fomentar la investigación.*

No querría olvidarme a nadie, así que agradezco a todos con los que he coincidido en un momento u otro a lo largo de estos años por los conocimientos, sugerencias, opiniones y consejos tan útiles que han aportado.

Y ya en el ámbito extra-laboratorio, le agradezco enormemente a mi familia, especialmente a mi padre Antonio, a mi madre Odile y a mi hermano Carles su ayuda, apoyo incondicional y tantas cosas más que aportan a mi vida en general. También un especial agradecimiento a mi otra familia, M. Paz y Jordi, y por supuesto agradecerle a Jose, mi “compañero de la vida”, el haber sufrido esta tesis, haber aguantado mis momentos bajos y haberme apoyado en todo momento.

# ÍNDICE



ÍNDICE.....	9
ABREVIATURAS .....	17
INTRODUCCIÓN.....	23
1- El sistema hematopoyético: desarrollo y estructura.....	25
2- Trasplante de progenitores hematopoyéticos .....	27
2.1- Tipos de trasplante de progenitores hematopoyéticos.....	28
2.2- Acondicionamiento en el trasplante de progenitores hematopoyéticos .....	30
2.3- Tipos de quimerismo hematopoyético. Modelos experimentales para su estudio .....	31
3- Terapia génica hematopoyética .....	33
3.1- Mecanismos de transferencia génica.....	34
3.2- Vectores retrovirales .....	36
3.2.1- Características, estructura y componentes de los retrovirus.....	36
3.2.2- Producción de vectores retrovirales recombinantes.....	39
3.2.3- Seudotipado de los retrovirus recombinantes: tipos de envueltas .....	41
3.3- La EGFP como gen marcador.....	42
3.4- Protocolos clínicos de terapia génica con vectores retrovirales en el sistema hematopoyético.....	44
3.5- Terapia génica y seguridad .....	45
4- Tolerancia inmunológica .....	46
4.1- La presentación de antígenos .....	47
4.1.1- Antígenos endógenos (intracelulares): vía de clase I .....	48
4.1.2- Antígenos exógenos (extracelulares): vía de clase II.....	48
4.2- Mecanismos de tolerancia T .....	51
4.2.1- Tolerancia central.....	51
4.2.2- Tolerancia periférica.....	52
4.3- Tolerancia B .....	55
4.4- Pérdida de tolerancia: las enfermedades autoinmunes .....	55
4.5- Quimerismo hematopoyético y tolerancia .....	56
5- La esclerosis múltiple .....	56
6- La encefalomielitis autoinmune experimental .....	57
6.1- Inducción de la EAE .....	57
6.1.1- Susceptibilidad .....	58
6.1.2- Antígenos .....	58
6.2- Curso clínico.....	59

6.3- Histopatología .....	60
6.4- Patogenia .....	60
6.5- Terapias emergentes para el tratamiento de la EM .....	62
6.6- Limitaciones del modelo animal de la EM .....	65
<b>PRESENTACIÓN .....</b>	<b>67</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>71</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>75</b>
1- Construcción de los vectores retrovirales .....	77
2- Obtención de líneas celulares productoras de vectores retrovirales.....	80
3- Titulación de las líneas productoras NX-e/liMOG23 y NX-e/li7 .....	82
4- Transducción y trasplante hematopoyético.....	83
4.1- Ratones .....	83
4.2- Obtención de células de MO .....	83
4.3- Transducción de células de MO.....	84
4.3.1- <i>Tratamiento de las placas de cultivo con RetroNectin®</i> .....	84
4.3.2- <i>Preestimulación de las células de MO con citocinas</i> .....	85
4.3.3- <i>Obtención del sobrenadante rico en retrovirus recombinantes</i> .....	85
4.3.4- <i>Transducción de células de MO con vectores retrovirales</i> .....	86
4.4- Secuenciación de las construcciones liMOG e li a partir de ADN genómico de MO transducida .....	87
4.5- Trasplante de células de MO transducida .....	88
4.5.1- <i>Acondicionamiento de los ratones receptores</i> .....	88
4.5.2- <i>Trasplante de células de MO</i> .....	89
4.5.3- <i>Seguimiento del trasplante</i> .....	89
5- Inducción de la EAE y seguimiento clínico.....	90
5.1- Inducción de la EAE en el modelo no remitente .....	90
5.2- Inducción de la EAE en el modelo remitente-recurrente.....	90
6- Evaluación del efecto de la mieloablación parcial en el modelo remitente- recurrente de la EAE .....	91
6.1- Irradiación.....	91
6.2- Agentes quimioterápicos .....	91
7. Obtención de células y tejidos a estudiar .....	91
7.1- Sacrificio y perfusión de los ratones.....	91
7.2- Obtención y fijación del SNC.....	91
7.3- Histopatología del SNC .....	92

8- Ensayos inmunológicos.....	92
8.1- Cultivos de esplenocitos para cuantificar la producción de citocinas.....	92
8.2- ELISPOT para detectar la producción de IFN- $\gamma$ .....	93
8.2.1- <i>Cuantificación de la frecuencia de células productoras de IFN-<math>\gamma</math> específicas para MOG<sub>40-55</sub></i> .....	93
8.2.2- <i>Cuantificación de la frecuencia de células productoras de IFN-<math>\gamma</math> específicas para EGFP</i> .....	94
8.3- ELISPOT para detectar la producción de IL-17 .....	95
8.4- Determinación de anticuerpos anti-MOG y anti-EGFP en suero mediante ELISA .....	96
8.4.1- <i>ELISA para detectar anticuerpos anti-MOG<sub>40-55</sub></i> .....	96
8.4.2- <i>ELISA para detectar anticuerpos anti-EGFP</i> .....	96
9- Análisis por citometría de flujo .....	97
9.1- Marcaje de células hematopoyéticas por técnicas de inmunofluorescencia .....	97
9.1.1- <i>Marcaje de superficie directo</i> .....	97
9.1.2- <i>Marcaje de superficie indirecto</i> .....	98
9.1.3- <i>Marcaje intracelular indirecto</i> .....	98
9.1.4- <i>Determinación de la concentración de citocinas solubles en el medio de cultivo de esplenocitos</i> .....	99
9.2- Eficiencia de transducción.....	99
9.3- Quimerismo del donante y quimerismo molecular .....	100
9.4- Expresión de los transgenes li e liMOG .....	100
9.5- Linajes y poblaciones hematopoyéticas .....	100
9.6- Análisis y valoración de los datos citométricos .....	101
10- Análisis estadístico .....	103
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>105</b>
<b><u>PARTE I. INDUCCIÓN DE TOLERANCIA EN LA EAE MEDIANTE LA EXPRESIÓN DE UN AUTOANTÍGENO EN EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO: APROXIMACIONES PREVENTIVAS Y TERAPÉUTICAS</u></b> .....	<b>107</b>

1- Obtención de líneas productoras de título viral elevado .....	107
2- Evaluación de la expresión de los transgenes .....	107
3- Eficiencia de transducción de las células murinas de MO .....	109
4- Efecto del régimen de acondicionamiento sobre la EAE remitente-recurrente.....	109
4.1- La irradiación empeora los signos clínicos de la enfermedad.....	109
4.2- Dosis parcialmente mieloablativas de busulfán no modifican el curso clínico de la EAE .....	111
5- Prevención de la EAE no remitente mediante la creación de quimerismo molecular en el sistema hematopoyético .....	112
5.1- Dosis parcialmente mieloablativas de busulfán no modifican el curso clínico de enfermedad en el modelo no remitente.....	112
5.2- El trasplante de células de MO transducidas con el autoantígeno MOG <sub>40-55</sub> previene la EAE .....	113
5.3- El grado de protección frente a la EAE no está asociado al nivel de quimerismo molecular en los ratones trasplantados con MO transducida con el vector liMOG .....	115
5.4- Menor producción de anticuerpos anti-MOG <sub>40-55</sub> en ratones trasplantados con células de MO que expresan el autoantígeno .....	116
6- Mejoría del curso clínico de la EAE no remitente establecida tras el trasplante de MO expresando el autoantígeno .....	117
6.1- Los signos clínicos de la EAE revierten o mejoran tras el trasplante con células de MO expresando liMOG .....	117
6.2- Los parámetros histopatológicos mejoraron en los ratones trasplantados con células de MO que expresaban el autoantígeno .....	118
6.3- La presencia de anticuerpos específicos frente a MOG <sub>40-55</sub> no es predictiva de la evolución de la enfermedad .....	123
6.4- Aumento de la producción de IL-5 e IL-10 en los ratones trasplantados con MO que expresaba el autoantígeno .....	123
6.5- Ausencia de quimerismo molecular en los ratones trasplantados con MO que expresa el autoantígeno .....	126
6.6- Mejoría clínica de la enfermedad en ausencia de acondicionamiento .....	128
6.7- Contribución de las células del donante a la reconstitución hemopoyética tras el trasplante .....	129
6.8- Las células trasplantadas tienen un fenotipo fundamentalmente mieloide .....	129
<b>PARTE II. INFLUENCIA DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DEL TRANSGÉN EGFP EN LA INMUNOGENICIDAD DE LAS CÉLULAS TRANSDUCIDAS .....</b>	<b>131</b>

1- Ausencia de quimerismo molecular en los ratones trasplantados con MO transducida con el vector SF1-EGFP .....	131
2- Mayor intensidad en la expresión de la EGFP con el vector SF1-EGFP .....	134
3- El desarrollo de una respuesta humoral anti-EGFP no es predictiva del rechazo inmunológico .....	134
4- Respuesta inmune celular frente a injertos con elevada expresión de EGFP .....	135
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>139</b>
<b><u>PARTE I.</u></b> INDUCCIÓN DE TOLERANCIA EN LA EAE MEDIANTE LA EXPRESIÓN DE UN AUTOANTÍGENO EN EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO: APROXIMACIONES PREVENTIVAS Y TERAPÉUTICAS.....	141
<b><u>PARTE II.</u></b> INFLUENCIA DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DEL TRANSGÉN EGFP EN LA INMUNOGENICIDAD DE LAS CÉLULAS TRANSDUCIDAS .....	159
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>165</b>
<b><u>PARTE I.</u></b> INDUCCIÓN DE TOLERANCIA EN LA EAE MEDIANTE LA EXPRESIÓN DE UN AUTOANTÍGENO EN EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO: APROXIMACIONES PREVENTIVAS Y TERAPÉUTICAS.....	167
<b><u>PARTE II.</u></b> INFLUENCIA DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DEL TRANSGÉN EGFP EN LA INMUNOGENICIDAD DE LAS CÉLULAS TRANSDUCIDAS .....	169
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>171</b>



# **ABREVIATURAS**



5-FU:	5-fluorouracilo
7-AAD:	7-aminoactinomicina D
ADA:	adenosina desaminasa
ADN:	ácido desoxirribonucleico
APC:	célula presentadora de antígeno
APhC:	aloficocianina
APP:	proteína precursora amiloide
ARN:	ácido ribonucleico
BHE:	barrera hematoencefálica
BHK/MKL:	línea celular de riñón embrionario de hamster transfectada establemente con ligando de <i>Kit</i> murino
BSA:	albúmina de suero bovino
CA:	proteínas de la cápside
cADN:	ácido desoxirribonucleico complementario
CLIP:	péptido asociado a la cadena invariante de las moléculas de histocompatibilidad de clase II
CMH:	célula madre hematopoyética
CMN:	célula mononucleada
CNPasa:	2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa
DC:	célula dendrítica
DMEM:	medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
DMSO:	dimetil sulfóxido
EAE:	encefalomielitis autoinmune experimental
EGFP:	proteína verde fluorescente mejorada
EICH:	enfermedad del injerto contra el huésped
EM PP:	esclerosis múltiple primariamente progresiva
EM RR:	esclerosis múltiple remitente-recurrente
EM SP:	esclerosis múltiple secundariamente progresiva
EM:	esclerosis múltiple
FCS:	suero bovino fetal
FS:	<i>forward scatter</i>
GALV:	virus de la leucemia del gibón
GFP:	proteína verde fluorescente
GM-CSF:	factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
HBSS:	solución salina tamponada de Hank
HLA:	antígenos leucocitarios humanos
i.p.:	intraperitoneal
i.v.:	intravenoso

ICT:	irradiación corporal total
IFN:	interferón
Ig:	inmunoglobulina
li:	cadena invariante
IL:	interleucina
IMDM:	medio de cultivo Dulbecco modificado de Iscove
IN:	integrasa
IRES:	sitio interno de entrada del ribosoma
Lin <sup>-</sup> :	ausencia de expresión de marcadores de linaje
LTR:	secuencias repetitivas largas de los extremos
MA:	proteínas de la matriz
MAG:	proteína asociada a la mielina
mARN:	ácido ribonucleico mensajero
MBP:	proteína básica de la mielina
MFI:	media de intensidad de fluorescencia
mHA <sub>g</sub> :	antígeno menor de histocompatibilidad
MHC-I:	complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I
MHC-II:	complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II
MHC:	complejo mayor de histocompatibilidad
MO:	médula ósea
MOBP:	proteína mielínica básica asociada a los oligodendrocitos
MOG:	glicoproteína mielínica de los oligodendrocitos
MOI:	multiplicidad de infección
MoMuLV:	virus de la leucemia murina de Moloney
mSCF:	factor de crecimiento de células madre murino
NC:	proteínas de la nucleocápside
NK:	células asesinas naturales
OSP:	glicoproteína específica de los oligodendrocitos
p.i.:	post inmunización
PBA-azida:	PBS con albúmina sérica bovina y acida sódica
PBS:	solución salina tamponada con fosfato
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
PE:	ficoeritrina
PHA:	ficohemaglutinina
PI:	partículas infecciosas
PIC:	complejo de preintegración
PLP:	proteína proteolipídica

## Abreviaturas

PMA:	acetato de forbol miristato
PR:	proteasa
RPMI:	medio de cultivo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR:	reacción en cadena de la polimerasa inversa
RT:	transcriptasa reversa
Sca:	antígeno de células madre
SNC:	sistema nervioso central
SP:	sangre periférica
SS:	<i>side scatter</i>
SU:	glicoproteína de la superficie
TAP:	transportador asociado al procesamiento de antígenos
tARN:	ácido ribonucleico de transferencia
TCR:	receptor de la célula T
TGF:	factor de crecimiento transformante
Th:	linfocito T colaborador
TM:	glicoproteína transmembranal
TNF:	factor de necrosis tumoral
Tp:	toxina pertussis
TPH:	trasplante de progenitores hematopoyéticos
Tr1:	célula T reguladora de tipo 1
Treg:	célula T reguladora natural
VSV-G:	proteína G del virus de la estomatitis vesicular
WEHI:	línea celular <i>Walter and Elizabeth Hall Institute</i>
WT:	<i>wild type</i>

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