



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

INSTITUT DE NEUROCIÈNCIES

**INMUNOMODULACIÓN DE LA VÍA TH17
COMO ESTRATEGIA TERAPÉUTICA PARA
LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

TESIS DOCTORAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA
MOLECULAR Y BIOMEDICINA

MARCOS TEJERO AMBROSIO

MAYO, 2020



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**INMUNOMODULACIÓN DE LA VÍA TH17
COMO ESTRATEGIA TERAPÉUTICA PARA
LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

Memoria presentada por

Marcos Tejero Ambrosio

Para optar al grado de

Doctor en Bioquímica, Biología molecular y Biomedicina

Tesis realizada bajo la codirección del Dr. Miguel Chillón del Institut de Neurociències y la Dra. Carmen Espejo del Institut de Recerca Vall d'Hebron

Director

Directora

Doctorando

Miguel Chillón Rodríguez

Carmen Espejo Ruiz

Marcos Tejero Ambrosio

MAYO, 2020

AGRADECIMIENTOS

Cualquiera en mi situación sabrá que una tesis doctoral, más allá del trabajo que queda escrito, es un esfuerzo colectivo que involucra a muchas personas, tanto en el propio ámbito profesional como en el personal. Durante todos los años de realización de este trabajo, he coincidido con muchas personas que, de una manera u otra, han contribuido para que este proyecto haya sido posible. A todas ellas no tengo mucho más que decirles, aparte de infinitas gracias.

En primer lugar, quiero dar las gracias a los directores de este trabajo, el Dr. Miguel Chillón y la Dra. Carmen Espejo, por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis doctoral y por la confianza depositada en mí desde el principio. Muchísimas gracias a los dos por compartir conmigo vuestra experiencia, vuestro conocimiento e incluso parte de vuestro tiempo.

A los miembros de la Unidad de Producción de Vectores (UPV) por su predisposición y por la ayuda prestada en todo momento.

A todos mis compañeros del laboratorio. A los que están actualmente y a los que han estado, por enseñarme a trabajar, a pensar y a divertirme con la ciencia.

A todos los alumnos de prácticas por permitirme compartir mi experiencia con ellos.

A todos los profesores que he tenido durante toda mi vida, desde el primero que me enseñó la diferencia entre un triángulo y un cuadrado hasta aquellos que me han enseñado conceptos complejísimo. A todos vosotros, gracias por haberme guiado hasta hoy.

A toda mi familia por el apoyo en todo momento y por toda su paciencia durante tantos años.

Por último, a toda la gente que cada mañana me ha hecho compañía en las caravanas de la AP-7. Sin vosotros hubiese llegado siempre demasiado pronto.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	13
RESUMEN	17
INTRODUCCIÓN	21
1. ENFERMEDADES AUTOINMUNES.....	23
2. ESCLEROSIS MÚLTIPLE.....	25
2.1. Epidemiología de la esclerosis múltiple.....	28
2.2. Etiología de la esclerosis múltiple.....	29
2.3. Factores genéticos.....	29
2.4. Factores ambientales.....	31
2.4.1. Latitud y exposición a la luz solar.....	32
2.4.2. Factores hormonales.....	33
2.4.3. Factores infecciosos.....	35
2.4.4. Consumo de tabaco.....	36
2.4.5. Hábitos alimenticios.....	36
2.5. Generalidades del sistema inmune y la autoinmunidad.....	37
2.5.1. Papel de las citoquinas en la diferenciación celular.....	39
2.5.2. Diferenciación y mantenimiento de células Th17.....	40
2.5.3. Interleuquina 7.....	41
2.5.4. Interleuquina 23.....	45
2.5.5. Papel de las células Th17 en la inflamación y en la patología autoinmune.....	46
2.6. Inmunopatogenia de la esclerosis múltiple.....	48
2.6.1. Autoantígenos.....	49
2.6.2. Células T autoreactivas.....	50
2.6.3. Células B autoreactivas.....	52
2.6.4. Células T reguladoras.....	53
2.6.5. Migración de las células inmunes al SNC y formación del foco inflamatorio...54	
2.6.6. Neurodegeneración asociada a la inflamación crónica del SNC.....	55
2.7. Tratamientos actuales de la esclerosis múltiple.....	57
2.8. Estrategias terapéuticas para enfermedades autoinmunes.....	59
3. MODELOS ANIMALES PARA LA INVESTIGACIÓN PRECLÍNICA DE LA EM.....	63
3.1. Encefalomielitis autoinmune experimental.....	63

3.1.1.	EAE activa	63
3.1.2.	EAE por transferencia pasiva.....	64
3.2.	Otros modelos para el estudio de la esclerosis múltiple	65
3.2.1.	Modelo de encefalitis murina de Theiler	65
3.2.2.	Modelos de desmielinización inducida por toxicidad	65
4.	TERAPIA GÉNICA.....	66
4.1.	Descripción y generalidades.....	66
4.2.	Vectores virales	68
4.3.	Características de los vectores para terapia génica	69
4.4.	Vectores adenoasociados.....	70
4.4.1.	Características de los AAVs como vectores de terapia génica	73
	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	77
	RESULTADOS.....	81
1.	CLONACIÓN DEL GEN TERAPÉUTICO sIL-7R EN VECTORES PARA TERAPIA GÉNICA	83
1.1.	Clonación del gen sIL-7R en un vector adenoviral	83
1.2.	Clonación del gen sIL-7R en un vector adenoasociado	85
2.	GENERACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN sIL-23R-sIL-7R COMO MOLÉCULA TERAPÉUTICA PARA LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE.....	87
3.	PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VECTORES TERAPÉUTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE	90
3.1.	Vectores adenovirales Ad5.....	90
3.1.1.	Producción de vectores adenovirales	90
3.1.2.	Caracterización de los vectores adenovirales	90
3.2.	Vectores adenoasociados.....	95
3.2.1.	Producción de vectores adenoasociados	95
3.2.2.	Caracterización <i>in vitro</i> de los vectores adenoasociados.....	98
3.2.3.	Caracterización <i>in vivo</i> de los vectores adenoasociados	101
4.	INTERACCIÓN <i>IN VITRO</i> ENTRE sIL-23R E IL-23	104
4.1.	Puesta a punto del cultivo primario de esplenocitos.....	104
4.2.	Bloqueo de la actividad de IL-23 mediante sIL-23R	106
5.	INTERACCIÓN <i>IN VITRO</i> ENTRE sIL-7R E IL-7	107
5.1.	Clonación de los genes sIL-7R y sIL-23R-sIL-7R en proteínas de fusión GST	107
5.2.	Generación de un anticuerpo contra la región extracelular del receptor IL-7R	108
5.3.	Producción de proteínas GST en eucariotas para ensayos de interacción	110

5.4.	Producción de proteínas GST en procariotas para ensayos de interacción.....	111
5.5.	Puesta a punto del anticuerpo anti-IL-7.....	114
6.	APROXIMACIÓN TERAPÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DE LA EAE MEDIANTE VECTORES DE TERAPIA GÉNICA PORTADORES DE RECEPTORES SOLUBLES	115
6.1.	Efecto de la administración de vectores virales en ratones EAE	115
6.2.	Efecto de los vectores portadores de receptores solubles a dosis de 1×10^{11} vg/animal.....	125
6.3.	Efecto de los vectores portadores de receptores solubles a dosis de 5×10^{11} vg/animal.....	127
	DISCUSIÓN	145
1.	GENERACIÓN DE RECEPTORES SOLUBLES PARA EL BLOQUEO DE CITOQUINAS	149
2.	GENERACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN sIL-23R-sIL-7R PARA EL BLOQUEO DE CITOQUINAS.....	153
3.	GENERACIÓN DE VECTORES DE TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE LA EAE ..	155
4.	APROXIMACIÓN TERAPÉUTICA CON VECTORES AAVs PORTADORES DE RECEPTORES SOLUBLES	157
	CONCLUSIONES.....	163
	MATERIALES Y MÉTODOS.....	167
1.	MATERIALES	169
1.1.	Vectores plasmídicos.....	169
1.2.	Vectores virales	169
1.3.	Cultivos celulares <i>in vitro</i>	169
1.4.	Animales.....	170
2.	MÉTODOS.....	170
2.1.	Obtención y análisis de DNA	170
2.1.1.	Minipreparaciones de DNA plasmídico por lisis alcalina	170
2.1.2.	Maxipreparaciones de DNA plasmídico	171
2.1.3.	Preparación de bacterias quimiocompetentes	171
2.1.4.	Transformación de bacterias por choque térmico.....	172
2.1.5.	Electroforesis de DNA en gel de agarosa	173
2.1.6.	Purificación de fragmentos de DNA	174
2.1.7.	Cuantificación de la concentración de DNA.....	174
2.1.8.	Digestión mediante enzimas de restricción	174
2.1.9.	Clonación de fragmentos de DNA.....	174
2.1.10.	Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR	176

2.1.11.	Secuenciación.....	177
2.1.12.	Extracción de genomas virales en células de cultivo	177
2.1.13.	Extracción de genomas virales en tejido. Método de Hirt.....	177
2.1.14.	Cuantificación de DNA mediante PCR cuantitativa (qPCR)	178
2.2.	Obtención y análisis de RNA	179
2.2.1.	Extracción de RNA de células de cultivo	179
2.2.2.	Extracción de RNA de células de tejido.....	179
2.2.3.	Tratamiento con DNAsa I de muestras de RNA	180
2.2.4.	Retrotranscripción de muestras de RNA.....	180
2.3.	Obtención y análisis de proteínas	181
2.3.1.	Extracción de proteínas.....	181
2.3.2.	Cuantificación de proteínas.....	181
2.3.3.	Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)	182
2.3.4.	Tinción de geles PAGE con Azul de Coomassie (Coomassie Blue).....	183
2.3.5.	Electrotransferencia	183
2.3.6.	Inmunodetección	184
2.3.7.	Deshibridación de la membrana de PVDF o <i>Stripping</i>	184
2.3.8.	Producción y purificación de proteínas GST.....	185
2.3.9.	Actividad β -galactosidasa en muestras de tejido.....	186
2.4.	Técnicas generales de cultivo celular.....	186
2.4.1.	Mantenimiento de cultivos celulares en monocapa.....	186
2.4.2.	Criopreservación: congelación y descongelación de células	187
2.4.3.	Cultivos primarios de leucocitos de ratón o cultivos de esplenocitos	188
2.4.4.	Introducción de DNA plasmídico en células por transfección	188
2.4.5.	Ensayo de bloqueo de la actividad de IL-23 con sIL-23R <i>in vitro</i>	189
2.5.	Vectores virales	190
2.5.1.	Generación y purificación de vectores adenoasociados.....	190
2.5.2.	Determinación del título de los vectores adenoasociados	193
2.5.3.	Generación y purificación de vectores adenovirales	194
2.5.4.	Titulación de vectores adenovirales.....	197
2.5.5.	Infección de células con vectores virales	197
2.6.	Estudios <i>in vivo</i> con ratones EAE.....	198
2.6.1.	Inducción de la EAE en ratones y seguimiento clínico	198
2.6.2.	Obtención y fijación del SNC	199

2.6.3.	Estudios histopatológicos.....	200
2.6.4.	Ensayos de proliferación celular	201
2.6.5.	Análisis estadístico	201
BIBLIOGRAFÍA		203
ANEXO		233
1.	PLÁSMIDOS GENERADOS	235
2.	VECTORES VIRALES GENERADOS Y PRODUCIDOS.....	236
3.	PRIMERS	237
4.	OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LA GENERACIÓN DEL LINKER DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN sIL-23R-sIL-7R.....	238
5.	ANTICUERPOS.....	239

ABREVIATURAS

AAV	Virus adenoasociado
APC	Célula presentadora de antígeno
APS	Persulfato amónico
BHE	Barrera hematoencefálica
BSA	Albúmina sérica bovina
CAG	Chicken β -actin promoter
CFA	Adyuvante completo de Freund
CMV	Promotor principal del <i>Cytomegalovirus</i>
DC	Célula dendrítica
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAE	Encefalomiелitis autoinmune experimental
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EM	Esclerosis múltiple
FBS	Suero fetal bovino
FDC	Célula dendrítica folicular
GIT	Tracto gastrointestinal
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GST	Glutation-S-transferasa
GWAS	Estudio de asociación de genoma completo
HAd5 o Ad5	Adenovirus serotipo 5 humano
HEK	Células humanas embrionarias de riñón
HLA	Antígeno leucocitario humano
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IFA	Adyuvante incompleto de Freund
IL	Interleuquina
ITR	Repetición terminal invertida
IU	Unidades infecciosas
LB	Medio Luria Broth
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LTi	Células inductoras de tejidos linfoides
MAG	Glicoproteína asociada de la mielina

MAIT	Células T invariantes asociadas a mucosa
MBP	Proteína básica de la mielina
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MOG	Glicoproteína mielínica de los oligodendrocitos
MOI	Multiplicidad de infección
O/N	Durante la noche
ORF	Marco abierto de lectura
P/S	Penicilina/Estreptomicina
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PEG	Polietilenglicol
PEI	Polietilenimina
PFA	Paraformaldehído
PHA	Fitohemaglutinina
PLP	Proteína proteolipídica
PP	Partículas físicas
ROR	<i>Retinoid-related orphan receptor</i>
RT	Retrotranscripción
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
TCR	Receptor de células T
TEMED	Tetrametiletilenodiamida
TGF	Factor de crecimiento transformante
TNF	Factor de necrosis tumoral
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TSLP	Linfopoetina tímica estromal
UPV	Unidad de producción de vectores
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VLA	<i>Very late antigen</i>
vg	Genomas virales
WHP	Virus de la hepatitis de Woodchuck
WPRE	Elemento regulador post-transcripcional

Para algunas abreviaturas se ha mantenido la nomenclatura inglesa

RESUMEN

Los grandes avances científico-médicos del siglo XX han conseguido incrementar notablemente la esperanza de vida de la población mundial y, como consecuencia, han aumentado todas aquellas enfermedades asociadas con el deterioro del organismo como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas o las enfermedades autoinmunes. El incremento de la prevalencia de este tipo de enfermedades supone un gran problema social debido a que afectan gravemente a la calidad de vida de los pacientes, así como de sus familiares.

La esclerosis múltiple es una enfermedad autoinmune y desmielinizante del sistema nervioso central, con una aparición temprana que afecta a 2,5 millones de personas en todo el mundo.

En la actualidad, los tratamientos aprobados van dirigidos a controlar la respuesta inmune y únicamente frenan el progreso de la enfermedad pero no consiguen evitar la discapacidad a largo plazo. Además, el coste en medicamentos, así como de los cuidados multidisciplinarios que los pacientes requieren durante toda su vida constituyen un problema social, económico y sanitario elevado, haciendo cada vez más importante la investigación de una cura eficaz.

Durante los últimos años, se han publicado múltiples trabajos que implican a las células Th17 en el desarrollo de diferentes enfermedades autoinmunes y, por consiguiente, se han intentado desarrollar nuevas terapias orientadas al bloqueo de la generación de estas células, así como de las acciones de esta estirpe celular.

En este trabajo nos propusimos la utilización de una estrategia de terapia génica, no basada en el uso de anticuerpos, sino en el uso de receptores solubles para las interleuquinas (IL)-23 e IL-7 con el objetivo de actuar como agentes inhibidores de su función sobre sus correspondientes receptores transmembrana.

En primer lugar, se clonaron los genes candidatos en vectores virales y se caracterizaron tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, se generó una nueva molécula formada por los receptores solubles de IL-23 y de IL-7 con el objetivo de generar una terapia con un efecto dual.

Posteriormente, se comprobó la funcionalidad de los diferentes receptores solubles, donde se demostró que el receptor soluble de IL-23 generado es capaz de unir IL-23 *in vitro* y bloquear su unión con su respectivo receptor transmembrana.

Finalmente, se administraron diferentes vectores portadores de receptores solubles en el modelo murino de la esclerosis múltiple, la encefalomiелitis autoinmune experimental para analizar su potencial terapéutico. Los resultados expuestos en este trabajo demuestran que los diferentes receptores solubles tienen un efecto beneficioso en la evolución de la enfermedad reduciendo la incidencia y la gravedad de la sintomatología en los ratones tratados.

En resumen, nuestros resultados sugieren que el empleo de una terapia génica inmunomoduladora para la esclerosis múltiple basada en el uso de vectores virales portadores de receptores solubles podría tener un efecto terapéutico en la esclerosis múltiple.

INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Los grandes avances científico-médicos de las últimas décadas, han logrado incrementar la esperanza de vida de la población mundial y, con ello, está aumentando la prevalencia de todas aquellas enfermedades asociadas a desregulaciones de la homeóstasis debido a una vida más longeva. Enfermedades como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas, como por ejemplo el Alzheimer, o las enfermedades autoinmunes son cada vez más frecuentes en nuestra sociedad. Este tipo de enfermedades provocan un gran impacto socio-económico ya que suele tratarse de enfermedades de curso lento que se prolongan hasta el final de la vida del paciente con grandes costes tanto a nivel de dependencia como a nivel de tratamientos.

Las enfermedades autoinmunes son aquellas enfermedades asociadas a una desregulación del sistema inmune y se producen cuando el organismo desarrolla una respuesta inmune anómala contra alguno de sus órganos o tejidos.

Las enfermedades autoinmunes se han clasificado, clásicamente, en enfermedades autoinmunes sistémicas, las cuales afectan a más de un órgano o tejido como por ejemplo el lupus eritematoso sistémico, y enfermedades órgano específicas, que afectan a un solo órgano o tejido, como es el caso de la diabetes mellitus tipo 1 o de la esclerosis múltiple (EM) (Tabla 1).

A pesar de que la etiología de las enfermedades autoinmunes sigue siendo desconocida, existen factores genéticos asociados a una mayor incidencia de enfermedades autoinmunes como algunos alelos de los antígenos leucocitarios humanos (HLA). Por otro lado, también existen factores ambientales asociados a la autoinmunidad como pueden ser algunas infecciones o factores físico-químicos (Belbasis et al., 2015).

Tabla 1. Principales enfermedades autoinmunes que afectan al ser humano.

ENFERMEDAD	ÓRGANO/TEJIDO DIANA	REACCIÓN INMUNITARIA
ENFERMEDADES AUTOINMUNES ESPECÍFICAS DE ÓRGANOS		
Enfermedad de Addison	Células suprarrenales	Autoanticuerpos
Anemia hemolítica autoinmunitaria	Proteínas de la membrana eritrocitaria	Autoanticuerpos
Síndrome de Goodpasture	Membranas basales renales y pulmonares	Autoanticuerpos
Enfermedad de Graves	Receptor de hormona estimulante del tiroides	Autoanticuerpos (estimulante)
Tiroiditis de Hashimoto	Proteínas y células tiroideas	Células T, autoanticuerpos
Púrpura trombocitopénica idiopática	Proteínas de la membrana plaquetaria	Autoanticuerpos
Diabetes mellitus insulino dependiente	Células β del páncreas	Células T, autoanticuerpos
Miastenia gravis	Receptores de acetilcolina	Autoanticuerpos
Infarto miocardio	Corazón	Autoanticuerpos
Anemia perniciosa	Células parietales gástricas; factor intrínseco	Autoanticuerpos
Glomerulonefritis posestreptocócica	Riñón	Complejos antígeno-anticuerpo
Esterilidad autoinmunitaria	Espermatozoides	Autoanticuerpos
Esclerosis múltiple	Sistema nervioso	Células T, autoanticuerpos
ENFERMEDADES AUTOINMUNES SISTÉMICAS		
Espondilitis anquilosante	Vértebras	Inmunocomplejos
Artritis reumatoide	Tejido conjuntivo	Autoanticuerpos, inmunocomplejos
Esclerodermia	Corazón, pulmones, conducto gastrointestinal, riñón	Autoanticuerpos
Síndrome de Sjögren	Glándulas salivales, hígado, riñón, tiroides	Autoanticuerpos
Lupus eritematoso sistémico	Membranas eritrocitarias y plaquetarias	Autoanticuerpos, inmunocomplejos

Adaptado de: Inmunología de Kuby. Kindt et al. McGraw-Hill Interamericana Editores. 2007. 6ª Edición.

2. ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La EM es una enfermedad autoinmune que afecta aproximadamente a dos millones y medio de personas en todo el mundo. Se trata de una enfermedad neuroinflamatoria crónica y desmielinizante que afecta al sistema nervioso central (SNC) produciendo discapacidad en adultos jóvenes especialmente en mujeres. Debido a que la edad media de inicio ronda los 30 años, la EM supone una gran carga socio-económica ya que suele afectar a personas durante el principal periodo de capacidad laboral y de planificación familiar. Además, aproximadamente la mitad de los pacientes acaba necesitando el uso de silla de ruedas alrededor de 25 años después del diagnóstico (Compston & Coles, 2008).

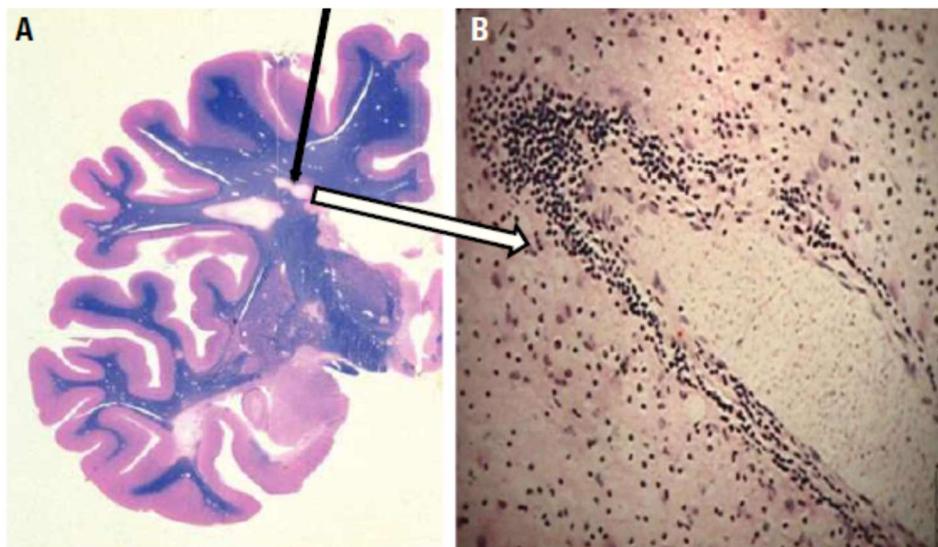


Figura 1. A. Placas de desmielinización en el cerebro con distribución periventricular (flecha negra). B. Infiltrado perivascular de células inflamatorias en el centro de una placa de EM. Fuente: Fernández et al. Esclerosis múltiple. Medicine. 2015.

La EM se caracteriza por la presencia de lesiones focales en la sustancia blanca del SNC denominadas placas (Figura 1), en las que lo más llamativo es la pérdida de mielina (desmielinización) con preservación relativa de los axones. Estas lesiones suelen ser múltiples y están distribuidas por todo el SNC, apareciendo

preferentemente en la sustancia blanca periventricular y subpial alrededor de vasos sanguíneos (Ferguson et al., 1997; Trapp et al., 1998). Por otro lado, también destacan las lesiones de la sustancia gris, cuya desmielinización y pérdida celular se asocia al deterioro cognitivo. Este tipo de lesiones representan el 26% del total y se localizan tanto en regiones corticales como subcorticales (Calabrese et al., 2015; Chard & Miller, 2009).

Tabla 2. Manifestaciones clínicas más frecuentes en la esclerosis múltiple según el tipo de síntoma de debut.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE	SÍNTOMA INICIAL (PORCENTAJE DE CASOS)	SIGNO O SÍNTOMA
Alteraciones de la sensibilidad	45%	Parestesias
		Alteración de la sensibilidad profunda
Alteraciones motoras	40%	Parálisis
		Debilidad
		Ataxia
Alteraciones del tronco cerebral	25%	Disartria
		Diplopía
		Nistagmo
		Disfagia
		Vértigo
Alteraciones del nervio óptico o quiasmo óptico	20%	Pérdida de agudeza visual
Alteraciones cerebelosas	10-20%	Temblor intencional
		Disartria cerebelosa

Adaptado de: Fernández et al. Esclerosis múltiple. Medicine 2015.

Se distinguen la lesión aguda, en la que el fenómeno patológico fundamental es la inflamación, y la lesión crónica en la que destacan la desmielinización, la degeneración axonal y la gliosis (Lucchinetti et al., 2000).

El curso clínico y la sintomatología de la EM es muy heterogéneo de manera que la sintomatología se correlaciona con la diseminación espacio-temporal de las lesiones a través del SNC. El síntoma de comienzo más frecuente es la alteración de la sensibilidad (45%), consistente en la aparición de sensaciones de pinchazos u hormigueo (parestesias) o acorchamiento de uno o más miembros (Tabla 2).

Entre los síntomas más frecuentes se encuentran la espasticidad muscular, la debilidad muscular o los trastornos de la marcha; afectaciones visuales como la neuritis óptica, el nistagmo o la diplopía; alteraciones de la percepción como puede ser el dolor, la hipostesia o parestesias; alteraciones del tránsito intestinal como la diarrea o la constipación; disartria, disfagia, incontinencia urinaria o trastornos centrales como fatiga, depresión, dificultad de concentración o pérdida de memoria a corto plazo (Kearney et al., 2015).

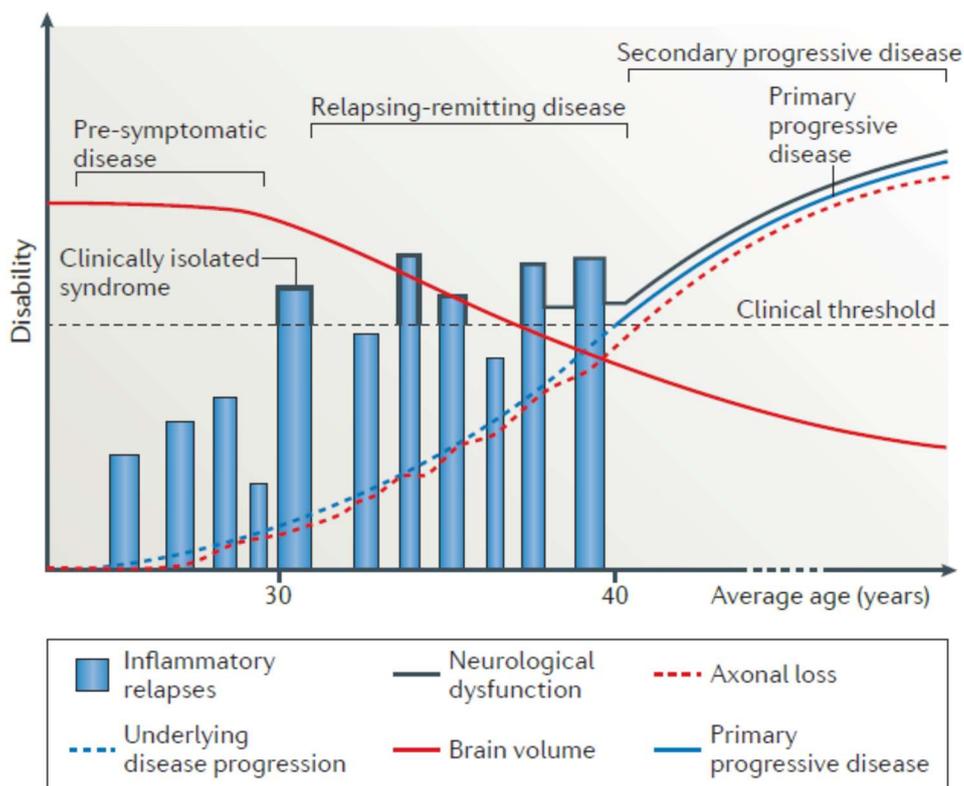


Figura 2. Esquema de los principales cursos clínicos de la esclerosis múltiple y su correspondencia con la pérdida axonal y la disminución del volumen cerebral en el tiempo. Fuente: Dendrou et al. Immunopathology of multiple sclerosis. Nature Reviews Immunology. 2015.

En función del curso clínico, se puede clasificar la EM en diferentes patrones de presentación (Lublin, 2014) (Figura2). Aproximadamente el 85% de los pacientes presentan la forma remitente-recurrente caracterizada por un episodio inicial de disfunción neurológica seguido de periodos de remisión o recuperación clínica y nuevos brotes de afectación neurológica. En estos casos, los periodos de recurrencia coinciden con inflamación y desmielinización observables por resonancia magnética principalmente en la sustancia blanca (Dendrou et al., 2015).

A medida que pasan los años, los periodos de remisión se van acortando, observándose cada vez más periodos activos. Así, el 80% de los pacientes acaba desarrollando la forma denominada secundaria progresiva donde ya no hay periodos de remisión y se caracteriza por una atrofia progresiva SNC, una reducción del volumen cerebral y un incremento de la pérdida axonal.

Alrededor del 10-15% de los pacientes son diagnosticados de la forma primaria progresiva. Esta presentación se caracteriza por la ausencia de periodos de remisión y una pérdida progresiva de las capacidades similar a la forma secundaria progresiva. Finalmente, existen variaciones menos frecuentes como el síndrome de Marburg o variante de Marburg que afecta a edades pediátricas y aparece como una variante muy severa y progresiva de la EM (Compston & Coles, 2008).

2.1. Epidemiología de la esclerosis múltiple

La EM tiene una prevalencia a nivel mundial de aproximadamente 30 individuos por cada 100.000 habitantes debutando entre los 20 y los 50 años de edad. La incidencia de la EM parece disminuir proporcionalmente con la distancia de los polos terrestres, y si bien es cierto que se han diagnosticado casos en todos los grupos étnicos, se observa mayor prevalencia en poblaciones caucásicas que en poblaciones africanas o asiáticas (Pugliatti et al., 2002). Además, se ha demostrado que existen poblaciones aparentemente resistentes a la EM como los lapones, los maoríes de Nueva Zelanda, los indios de Norte América, los huteritas de Saskatchewan de Canadá o los gitanos húngaros. España se sitúa entre los países

de riesgo medio-alto con una prevalencia de entre 80-100 por cada 100.000 habitantes (Fernandez et al., 1994; Izquierdo et al., 2015) y se ha podido ver como la prevalencia ha aumentado al doble en las últimas tres décadas (Koch-Henriksen & Sorensen, 2010; Pugliatti et al., 2006).

2.2. Etiología de la esclerosis múltiple

Hoy en día aún no se conoce la etiología exacta de la EM ni por qué existen diferentes formas de presentación y cursos clínicos. Del mismo modo que en la mayoría de enfermedades autoinmunes, existen factores genéticos de susceptibilidad, así como diversos factores ambientales asociados al desarrollo de la EM. Gracias a los estudios GWASs (*Genome-Wide Association Studies*) se han identificado alrededor de 233 regiones genéticas asociadas con la EM, así como 416 regiones más que potencialmente podrían estar asociadas también a la EM. En todos los casos en conjunto, se explica aproximadamente un tercio de todo el riesgo de sufrir EM (Consortium, 2019). No obstante, y a pesar de que los factores ambientales parecen ser proporcionalmente más relevantes que los factores genéticos, se ha avanzado mucho menos en el estudio de estos, ya que, en la mayoría de casos, los estudios epidemiológicos resultan demasiado complejos y generan conclusiones difíciles de interpretar (Belbasis et al., 2015).

2.3. Factores genéticos

Los estudios epidemiológicos y demográficos muestran una gran importancia de los factores genéticos en el inicio de la EM. En la mayoría de los casos, las variantes asociadas a un mayor riesgo de desarrollar EM son genes relacionados con el sistema inmune (Figura 3).

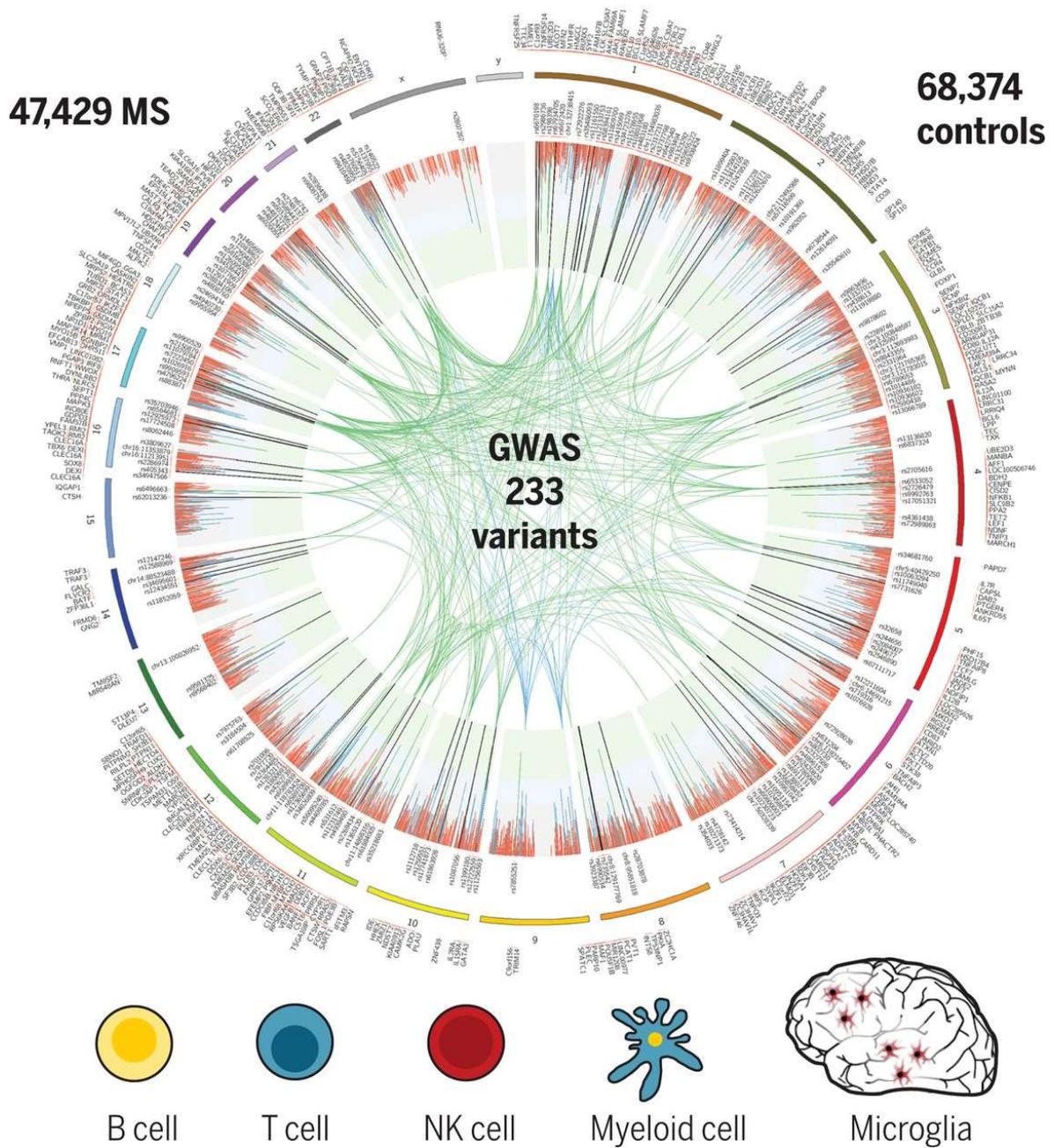


Figura 3. Atlas genético de la EM. En el círculo exterior se muestran representados numéricamente los diferentes cromosomas. En el interior del círculo, se muestran los genes no-HLA asociados a la EM y en verde su localización dentro del cromosoma. En la región interna, se muestra el grado de asociación con la EM, representado en azul un riesgo bajo y en rojo un riesgo mayor. Fuente: International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. Science. 2019.

Aunque no se ha demostrado un gen concreto asociado a la patología, se han descrito diversos genes que aumentan el riesgo relativo de desarrollar EM

(Consortium, 2019). La asociación más fuerte y estudiada se encuentra en los genes 13-18 del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) o antígeno leucocitario humano HLA, donde se ha observado que el haplotipo DR15 y cuatro alelos del HLA-DR2 (DRB1*1501, DRB5*0101, DQA1*0102, DQB1*0602) se asocian al desarrollo de EM en caucásicos (Haines et al., 1996). Por otro lado, también se ha observado variantes de los genes que codifican para las cadenas α de los receptores de la interleuquina (IL)-2 y la IL-7 (IL-2R α y IL7R α respectivamente). Estas dos interleuquinas juegan un importante papel en el desarrollo de las células T reguladoras (Treg) y de las células cooperadoras (Th) efectoras (Gregory et al., 2007; Hartmann et al., 2014; Lundstrom et al., 2013). Estudios similares han demostrado un incremento de la susceptibilidad en individuos que presentan una variante del gen CD86, un importante correceptor presente en todas las células presentadoras de antígeno necesario para la activación de los linfocitos T (Sawcer et al., 2011). También se han identificado variantes que confieren susceptibilidad que afectan a las células B como los genes CD40 y CXCR5 que incrementan el riesgo de EM, demostrando así el papel que juegan la activación y diferenciación de las células B en el desarrollo de la EM (Disanto et al., 2012).

2.4. Factores ambientales

Los estudios genéticos y epidemiológicos han demostrado que existe una importante predisposición genética al desarrollo de enfermedades autoinmunes. No obstante, estudios realizados con gemelos homocigotos han revelado una menor concordancia de la esperada, demostrando así el importante papel que juega el ambiente para el desarrollo de la EM (Fagnani et al., 2015; Hawkes & Macgregor, 2009; Pugliatti et al., 2002).

La mayoría de factores ambientales que se han descrito capaces de desencadenar la generación de células T autoreactivas han sido virus o microorganismos (Tabla 3). Además, algunas infecciones que afectan al SNC pueden liberar antígenos

propios del SNC a la periferia como se ha observado en estudios con el virus Theiler (Miller et al., 1997).

Tabla 3. Principales factores ambientales asociados a la aparición de la esclerosis múltiple y su razón de oportunidad (odds ratio) asociada.

FACTOR AMBIENTAL	ODDS RATIO APROXIMADO	REFERENCIA
Epstein-Barr Virus: Seropositividad IgG anti-EBNA (Epstein-Barr Nuclear Antigen)	4,46	Almohmeed et al., 2013
Epstein-Barr Virus: Seropositividad IgG anti-VCA (Viral Capsid Antigen)	4,52	Almohmeed et al., 2013
Epstein-Barr Virus: Mononucleosis infecciosa	2,17	Handel et al., 2010
Epstein-Barr Virus: DNA en células mononucleares y suero	1,84	Santiago et al., 2010
Epstein-Barr Virus: Seronegatividad IgG anti-EBV	0,13	Almohmeed et al., 2013
Índice de Masa Corporal >27 durante la adolescencia	2,20	Hedstrom et al., 2014
Consumo de tabaco	1,52	Handel et al., 2011
Apendicectomía antes de los 20 años de edad	1,17	Lunny et al., 2013
Vacunación: Difteria	0,60	Farez & Correale, 2011
Vacunación: Tétanos	0,71	Farez & Correale, 2011

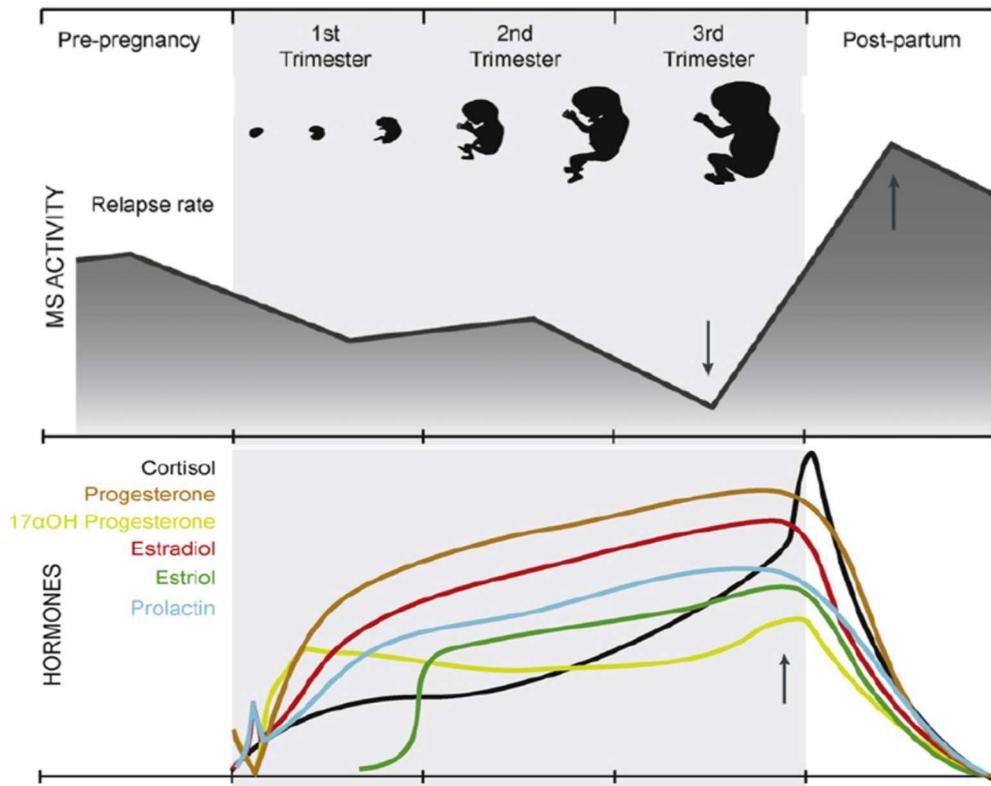
2.4.1. Latitud y exposición a la luz solar

Gracias a los estudios epidemiológicos, se ha podido observar que la prevalencia de la EM es más elevada como más elevada es la latitud y, además, también aparece una mayor prevalencia en países desarrollados de la misma latitud. Existen diversas teorías que tratan de resolver esta geodistribución. Una de las más

extendidas relaciona la EM con niveles reducidos de vitamina D. Según estas teorías, cuanto más cerca de los polos, la población está menos expuesta a la luz solar y, por tanto, produce menos vitamina D. Aunque se desconoce exactamente el rol que juega la vitamina D en el sistema inmune y la autoinmunidad, se han observado niveles inferiores de vitamina D en pacientes de EM que en la población control y, de hecho, niveles bajos de vitamina D se consideran un factor de riesgo para EM (Ascherio et al., 2014; Munger et al., 2006). Diferentes estudios sobre el efecto de la vitamina D sobre la autoinmunidad sugieren que podría tener un papel inmunomodulador con capacidad antiinflamatoria (Gregori et al., 2001; Schleithoff et al., 2006). Además, también se ha reportado que niveles elevados de radiación ultravioleta de tipo B aumentan los niveles de células dendríticas (DC) tolerogénicas y células Treg, así como reducen los niveles de células T efectoras (Breuer et al., 2014).

2.4.2. Factores hormonales

Tal y como revelan los estudios de prevalencia, las enfermedades autoinmunes son, en general, más frecuentes en mujeres que en hombres con una proporción 3:1 en el caso de la EM. Este hecho sugiere que las variables hormonales juegan un papel diferenciador en la patogenia de la EM suponiendo un factor de riesgo. Sobre el papel de las hormonas en el desarrollo de las diferentes enfermedades autoinmunes, se ha podido observar que, durante el embarazo, se producen pocos brotes de la enfermedad, mientras que poco después del parto, aumenta el riesgo de aparición de un brote. Durante el embarazo, existe una regulación del sistema inmune para permitir la tolerancia materno-fetal. Se ha observado que a medida que avanza el embarazo, aumenta el estatus antiinflamatorio a través del aumento de la actividad de macrófagos M2, células Th2 y células Treg y disminuye la actividad de células NK, macrófagos M1, células Th1 y células Th17 debido al aumento de los niveles de estradiol, estriol y progesterona (Figura 4) (Patas et al., 2013; Robinson & Klein, 2012).



Factores anti-inflamatorios	Factores pro-inflamatorios
IL-4	IL-12
IL-10	IL-2
TGF-β	IFN-γ
C. Dendríticas tolerantes	TNF-α
Macrófagos M2	Macrófagos M1
Células Th2	Células Th1
Células Treg	Células Th17
Anticuerpos	Células NK

Figura 4. Actividad de la EM durante el embarazo y los principales cambios producidos en la actividad del sistema inmune. Adaptado de: Patas et al. Pregnancy and multiple sclerosis: feto-maternal immune cross talk and its implications for disease activity. *Journal of Reproductive Immunology*. 2013; y Robinson & Klein. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. *Hormones and Behavior*. 2012.

2.4.3. Factores infecciosos

Otro de los factores asociados al desarrollo de la EM y otras enfermedades autoinmunes ha sido la infección con el virus Epstein-Barr (EBV) durante la adolescencia (Compston & Coles, 2008). Aproximadamente el 90% de la población es seropositiva para el EBV. A pesar de que existen diversas explicaciones, una de las más aceptadas es la generación de células autoreactivas por mimetismo molecular. Se ha podido observar que uno de los antígenos nucleares del EBV, el EBNA-1 es muy similar a ciertas proteínas de la mielina y es capaz de desencadenar una respuesta de reactividad cruzada (Ascherio & Munger, 2007); y, de hecho, se han encontrado células T específicas para EBNA-1 con mayor frecuencia en pacientes de EM que en controles sanos (Lunemann et al., 2006). Además, también se han descrito anticuerpos IgG específicos para EBNA-1 en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes de EM (Bray et al., 1992).

Por otra parte, las colonizaciones del tracto gastrointestinal (GIT) por helmintos parecen producir un efecto protector frente a la EM. Además, en la misma línea, el hecho de que en los países industrializados hayan disminuido las infecciones por helmintos en las últimas décadas podía explicar, en parte, por qué la prevalencia de la EM es más elevada que en regiones menos desarrolladas de la misma latitud. De hecho, en las regiones industrializadas, la prevalencia de EM así como de otras enfermedades autoinmunes ha aumentado desde la segunda mitad del siglo XX. Diferentes estudios han demostrado que las infecciones por helmintos generan en el huésped un ambiente antiinflamatorio (Ben-Ami Shor et al., 2013; Versini et al., 2015). Basándose en estas teorías, se han realizado diferentes estudios en modelos animales con diferentes parásitos (Gruden-Movsesijan et al., 2010; Kuijk et al., 2012; La Flamme et al., 2003) e incluso un ensayo clínico de fase I (Fleming et al., 2011) con resultados prometedores estableciendo lo que actualmente se conoce como la teoría de la higiene. En dicho ensayo, los pacientes tratados con huevos de helmintos presentaron incrementos en los niveles de IL-4 e IL-10 y una menor captación de gadolinio en las pruebas de resonancia magnética practicadas.

2.4.4. Consumo de tabaco

Por otro lado, el tabaco fumado (pero no el masticado) se asocia con un riesgo incrementado de padecer EM. Aunque el rol del tabaco en la patogenia de la EM se desconoce y el incremento del riesgo es mucho menor que el resto de factores, se cree que la inhalación del humo del tabaco podría producir una irritación del parénquima pulmonar capaz de generar un estatus proinflamatorio que favorecería el desarrollo de la EM, así como otras enfermedades autoinmunes. Actualmente se estudian los efectos de la polución en el desarrollo de la EM y estudios futuros podrían revelar si otras formas de irritación pulmonar podrían contribuir a desarrollar EM (Belbasis et al., 2015).

2.4.5. Hábitos alimenticios

En los últimos años, se han publicado numerosos estudios que relacionan la obesidad con un elevado riesgo de sufrir EM. Aunque el mecanismo por el cual la obesidad aumenta el riesgo de EM no está claro, existen estudios que demuestran que la obesidad durante la adolescencia aumenta dos veces el riesgo de sufrir EM en la edad adulta. Este efecto es aún mayor con índices de masa corporal superiores a 27 (Hedstrom et al., 2014; Munger et al., 2009). Además, la obesidad infantil, también se relaciona con un desarrollo más temprano de la enfermedad (Langer-Gould et al., 2013).

Finalmente, también se han relacionado varios hábitos alimenticios con la EM. Se ha descrito que el consumo de café (>900ml diarios) reduce en un 30% el riesgo de desarrollar EM (Hedstrom et al., 2016). Además, la cafeína también se ha demostrado como un factor neuroprotector capaz de lograr una reducción de la neuroinflamación en modelos animales de EM (Chen et al., 2010). Por otro lado, también se ha podido demostrar que una dieta alta en sal promueve la diferenciación de las células Th17. Así, los ratones con dietas de alta cantidad de sal, desarrollan una forma más severa de encefalomiелitis autoinmune

experimental (EAE), modelo experimental de EM (Farez et al., 2015; Kleinewietfeld et al., 2013; Wu et al., 2013).

2.5. Generalidades del sistema inmune y la autoinmunidad

El sistema inmune tiene como objetivo mantener la integridad biológica del individuo frente a agresiones externas o internas. Para ello, el sistema inmune media dos clases de respuesta, la respuesta innata y la respuesta adaptativa. Mientras que los componentes de la respuesta innata reaccionan rápidamente a cambios en la homeóstasis, la respuesta adaptativa requiere más tiempo, pero es más específica.

Una respuesta inmune adaptativa eficiente es fundamental para que el huésped sea capaz de eliminar los diferentes antígenos patogénicos. Al mismo tiempo, también es crucial para la homeóstasis del huésped que el sistema inmune sea capaz de reconocer y tolerar tanto los antígenos propios como algunos antígenos externos, por ejemplo, aquéllos que se encuentran en la flora bacteriana comensal y en la comida. Uno de los grandes retos de la inmunología ha sido, y de hecho, aún lo es, resolver cómo el organismo es capaz de generar respuestas específicas contra determinados antígenos y tolerar otros.

El proceso de la respuesta adaptativa consta de diferentes fases. En primer lugar, se produce el reconocimiento del antígeno extraño por parte de una célula presentadora de antígenos (APC), su procesamiento y su presentación a los linfocitos. En segundo lugar, se produce la sinapsis entre los linfocitos y las APCs produciéndose la activación y posterior expansión clonal de los linfocitos antígeno-específicos. Posteriormente, los linfocitos se diferencian al fenotipo efector correspondiente e inactivan o eliminan los patógenos y, finalmente, se produce la inactivación de las células efectoras recuperando la homeostasis.

A mitades de los años 80, gracias al desarrollo de nuevas técnicas de laboratorio, se identificaron dos tipos de células T que producían diferentes factores de

crecimiento. Se estableció, entonces, la dicotomía Th1/Th2. Se observó que las denominadas células Th1 producían principalmente IL-2 e IFN- γ , mientras que las células Th2 producían IL-4 (Hu-Li et al., 1987; Mosmann et al., 1986).

El denominado paradigma Th1/Th2 implica a dos subtipos de células T CD4+. Las células Th1 están implicadas en la inmunidad celular, el control de patógenos intracelulares y la inflamación, mientras las células Th2 están implicadas en las respuestas mediadas por anticuerpos y el control de patógenos extracelulares.

El paradigma Th1/Th2 no es suficiente para explicar muchas evidencias experimentales, especialmente las derivadas de estudios de autoinmunidad. Según este paradigma, las células Th1 autoreactivas serían las implicadas en la destrucción tisular en enfermedades autoinmunes. Debido a eso, se predijo que la administración de IFN- γ (la principal citoquina efectora producida por las células Th1) favorecería la autoinmunidad y, sin embargo, su bloqueo mediante anticuerpos mejoraría el pronóstico de las enfermedades autoinmunes. No obstante, estudios en el modelo animal para la EM, la EAE, demostraron que la administración de IFN- γ reducía la severidad mientras que el bloqueo del IFN- γ mediante anticuerpos neutralizantes, producía una forma más severa de EAE (Billiau et al., 1988; Voorthuis et al., 1990). Así, en 1998 se descubrió una nueva subpoblación de células T CD4+ diferente de las clásicas Th1 y Th2 que producían IL-17 (Jovanovic et al., 1998). Esta población se denominó Th17 y su descubrimiento permitió entender la controversia que generaban los estudios de autoinmunidad, así como el mecanismo de respuesta frente a hongos como *Candida albicans* o ciertas bacterias extracelulares como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* o *Staphylococcus aureus*. Durante los siguientes años, sucesivos estudios tanto en modelos animales como en humanos, demostraron que el nuevo subtipo Th17 estaba implicado en diferentes enfermedades autoinmunes observándose, por ejemplo, niveles elevados de IL-17 en lesiones del SNC, en sangre y en LCR de pacientes con EM (Lock et al., 2002; Tzartos et al., 2008), en la mucosa de pacientes con colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn (Fujino et al., 2003), en la piel de pacientes con

psoriasis (Teunissen et al., 1998) y en tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (Kotake et al., 1999).

2.5.1. Papel de las citoquinas en la diferenciación celular

En respuesta a los diferentes patógenos, se producen diferentes factores capaces de diferenciar a las células T CD4+ en los diferentes linajes gracias a su capacidad de inducir la expresión de factores de transcripción y citoquinas específicas de cada subpoblación de células T (Leung et al., 2010) (Figura 5).

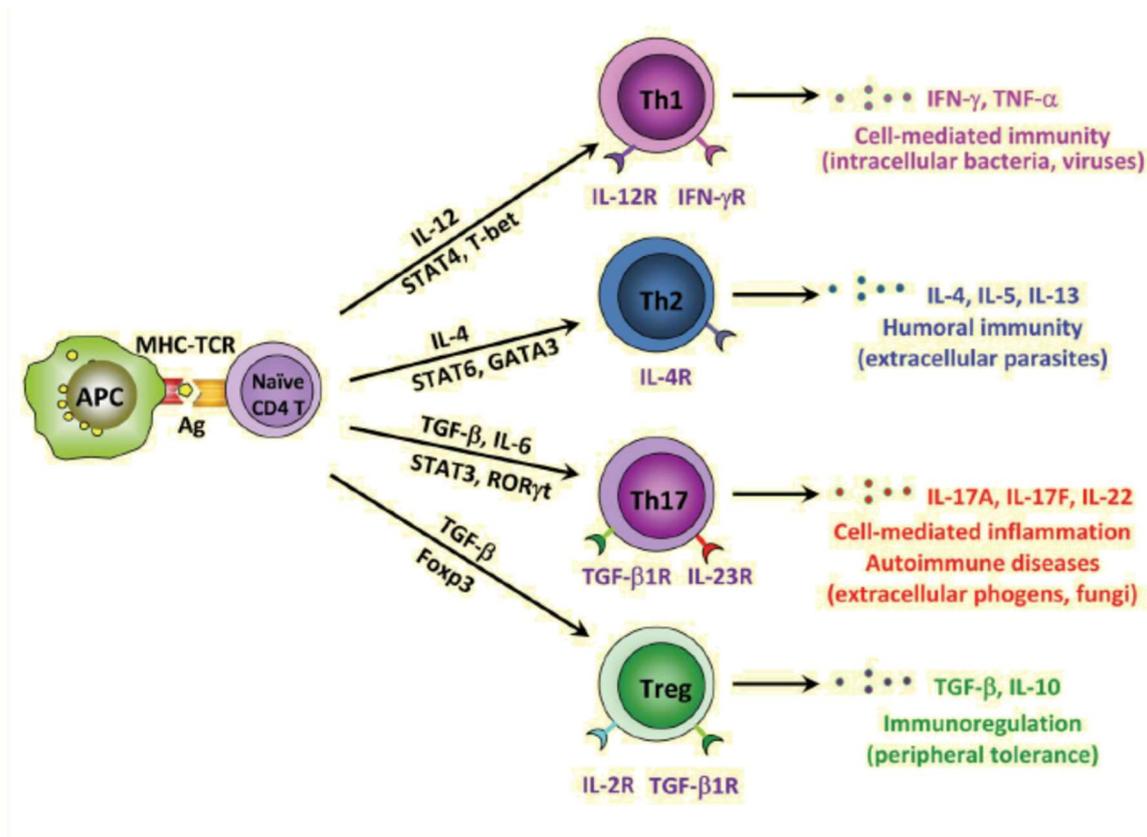


Figura 5. Principales subpoblaciones de células T CD4+ y su principal función en el sistema inmune. Adaptado de: Leung et al., The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. Cellular & Molecular Immunology. 2010.

En presencia de IL-12, las células T CD4+ *naïve* se polarizan hacia Th1 a través de la expresión de factores dependientes de STAT4 y T-bet. Las células Th1 producen grandes cantidades de IFN- γ y juegan un papel crucial en la defensa contra patógenos intracelulares a través de la activación de macrófagos. IL-4 promueve la diferenciación de las células T CD4+ *naïve* hacia Th2 a través de la activación de STAT6 y GATA3. Las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-13 e IL-25, las cuales son importantes en respuestas humorales frente a parásitos y patógenos extracelulares (Rengarajan et al., 2000; Szabo et al., 2000). Finalmente, tanto las células Th17 como las Treg requieren TGF- β (Factor de crecimiento transformante) para su diferenciación (Bettelli et al., 2006). IL-6 activa STAT3 que, en combinación con la señalización de TGF- β , activa la expresión de los factores de transcripción ROR γ t y ROR α (retinoid-related orphan receptor) resultando en la diferenciación hacia Th17 (Ivanov et al., 2006; Serada et al., 2008). TGF- β también activa la expresión del factor de transcripción Foxp3 que, en ausencia de IL-6, bloquea la actividad de ROR γ t y ROR α permitiendo la diferenciación a células Treg (Zhou et al., 2008).

2.5.2. Diferenciación y mantenimiento de células Th17

El desarrollo de las células Th17 en patologías autoinmunes consta de una primera etapa de diferenciación y una segunda etapa de supervivencia y expansión. Aunque se ha comprobado que el TGF- β e la IL-6 son las señales mínimas para la polarización a Th17, se ha demostrado que diversas citoquinas son capaces, también, de inducir la diferenciación de células *naïve* a células Th17 como por ejemplo IL-1 β , IL-21 e IL-23 contribuyendo al inicio de la patología (Aggarwal et al., 2003; Korn et al., 2007). Muchas de estas citoquinas, además, inducen la expresión de sus propios receptores aumentando así la señal. Un elemento crucial en el desarrollo de las células Th17 es la expresión del receptor de IL-23 (IL-23R) tras una primera señalización mediante TGF- β e IL-6 (Stritesky et al., 2008). Así, la

señalización a través del IL-23R por parte de la IL-23 favorece la amplificación y estabiliza las células Th17 en su fenotipo efector.

La IL-7 también se ha demostrado que juega un papel crucial en el mantenimiento *in vivo* de las células Th17 diferenciadas. El descubrimiento se llevó a cabo gracias a que uno de los factores genéticos asociados a la aparición de EM era un polimorfismo en el IL-7R α (Gregory et al., 2007). La IL-7 actúa como un factor de crecimiento de las células T, regulando la homeostasis periférica. Una vez activado el receptor de células T (TCR) en las células T *naïve*, se bloquea la expresión del IL-7R. Recientemente, se ha observado que el papel crucial que juega la IL-23 en la diferenciación terminal de las células Th17 podría ser debido a que induce la re-expresión del IL-7R (McGeachy et al., 2009). Además, se ha observado que el antagonismo del IL-7R altera el balance de las proteínas Bcl-2 y Bax provocando apoptosis de las células Th17 reduciendo la severidad clínica en el modelo de EAE (Liu et al., 2010).

2.5.3. Interleuquina 7

Las células T requieren a lo largo de su vida de la integración de señales para sobrevivir, proliferar y diferenciarse (Sprent & Surh, 2011), por lo que una desregulación de estas señales puede comportar tanto problemas de autoinmunidad como de linfopenia. Muchas fases del desarrollo de las células T se regulan a través de citoquinas de la familia γc . Estas citoquinas utilizan el receptor común γc combinado con otra subunidad específica formando un complejo receptor heterodimérico específico para las diferentes citoquinas. Algunos ejemplos de citoquinas de la familia γc son la IL-2 que resulta crucial para el mantenimiento de las células T efectoras y reguladoras (Barron et al., 2010; Dooks et al., 2004), la IL-4 que estimula la proliferación y diferenciación de las células Th2 (Lichtman et al., 1987) o la IL-9 que ayuda a la proliferación de las células Th17 (Noelle & Nowak, 2010).

La IL-7 es otra citoquina de la familia γc y utiliza el receptor IL-7R α (CD127) conjuntamente con la subunidad común γc para activar la señalización a través de la activación de STAT5 y PI3K (Jiang et al., 2005). Es importante remarcar que el IL-7R α no solo une IL-7, sino que también es capaz de activarse mediante la *Thymic Stromal Lymphopoietin* (TSLP) cuando dimeriza con el receptor de TSLP (Park et al., 2000).

A diferencia de las otras citoquinas de la familia γc , la IL-7 no está producida por células T, sino que la producen células estromales, células dendríticas foliculares o queratinocitos, así como algunas DCs o macrófagos (Hara et al., 2012; Link et al., 2007). Tanto la médula ósea como el timo son los principales lugares de producción de IL-7 donde juega un papel crucial en el desarrollo de las células T ya que se ha comprobado que los ratones deficientes tanto en IL-7 como en IL-7R α presentan graves deficiencias en el número de células del timo. Durante el desarrollo de las células T, el IL-7R α se expresa en las etapas de “doble negativo” y su señalización es imprescindible para alcanzar la fase de “doble positivo” donde el TCR se expresa. Una vez alcanzada esta fase, se deja de expresar el IL-7R α . Durante la etapa de doble positivo, se produce la selección positiva de los timocitos donde la falta de señalización a través del IL-7R α facilita la eliminación de aquellos que no unen al MHC propio. Tras la selección positiva, IL-7R α se vuelve a expresar de manera que la señalización de la IL-7 confiere señales antiapoptóticas que favorecen la continuidad de la diferenciación (Park et al., 2010). Mientras que una disminución en la expresión tanto de la IL-7 como del IL-7R α en el timo conducen a errores en el desarrollo y a la falta de células T maduras en la periferia, una sobreexpresión produce un número aberrante de timocitos y un elevado recuento de células T en la periferia que, a veces, conduce al desarrollo de linfomas o leucemia. No obstante, no existen evidencias claras de que el exceso de IL-7 produzca un aumento de células autoreactivas (Rich et al., 1993; Samaridis et al., 1991).

A parte de su imprescindible papel en el desarrollo de las células T, la función más característica de la IL-7 es impedir la apoptosis de los linfocitos maduros en la periferia (Figura 6).

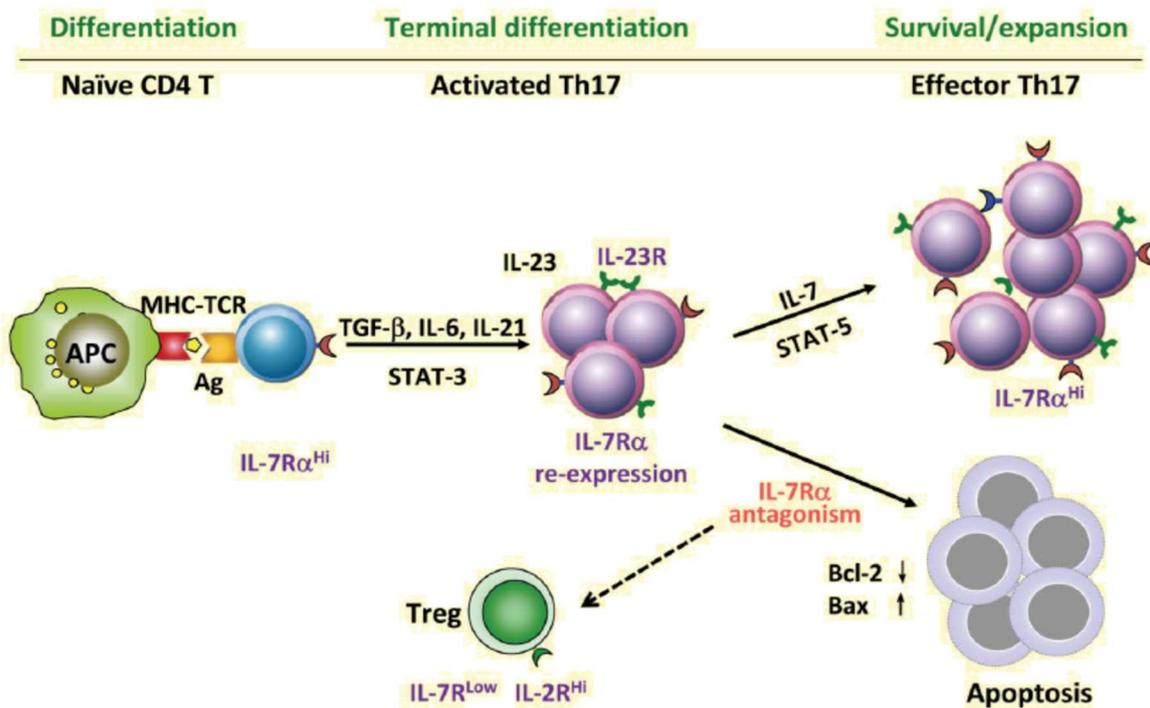


Figura 6. Papel de IL-23 e IL-7 y sus respectivos receptores en el desarrollo de células Th17 efectoras. Adaptado de: Leung et al., The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. Cellular & Molecular Immunology. 2010.

La supervivencia de las células T se mantiene a través de la activación del TCR o mediante la señalización con citoquinas. En ausencia de señalización a través del TCR (etapa *naïve* y de memoria), la activación del IL-7R α en las células T media la supervivencia mediante dos mecanismos: por un lado, activa la expresión de genes antiapoptóticos como Bcl-2 o Mcl-1, mientras que, por otro lado, aumenta la captación de glucosa y el metabolismo mediante la expresión del transportador de glucosa GLUT1 (Opferman et al., 2003; Rathmell et al., 2001). La IL-7, además, también es imprescindible para el paso de célula efectora a célula de memoria (Kondrack et al., 2003)(Figura 7).

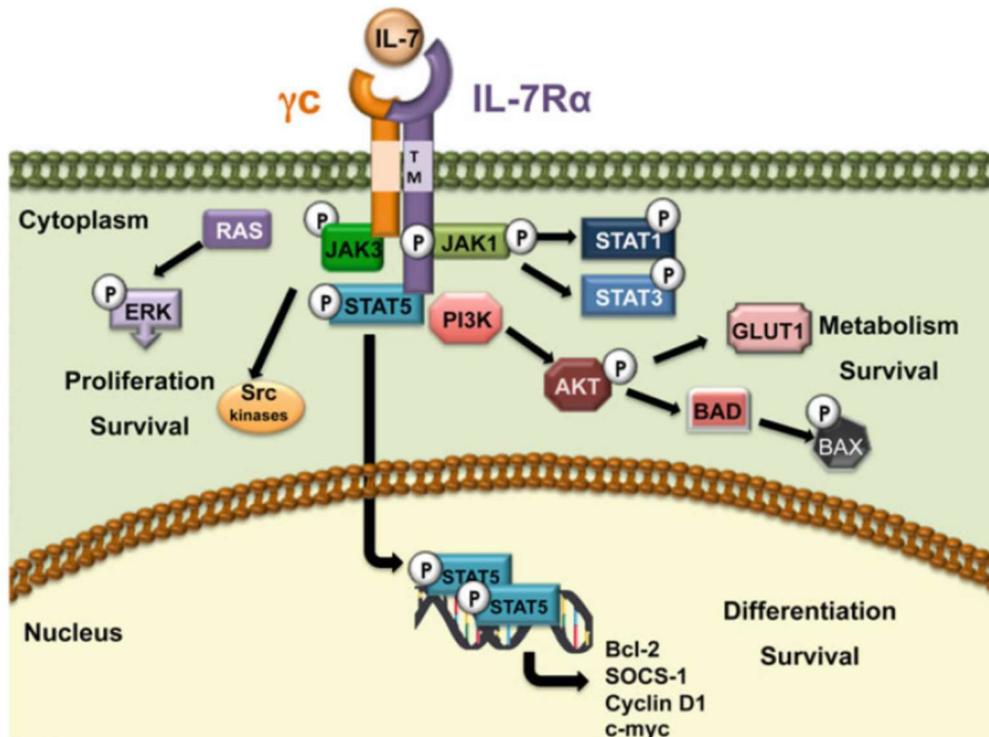


Figura 7. Vía de señalización del receptor de IL-7 y los principales factores intracelulares implicados en las diferentes funciones. Fuente: González-García et al. Notch1 and IL-7 receptor signalling in early T-cell development and leukaemia. Current Topics in Microbiology and Immunology. 2012.

A pesar de que aún a día de hoy existe controversia sobre el papel de la IL-7 en las enfermedades autoinmunes, parece claro que las células T autoreactivas también necesitan la IL-7 para su supervivencia. Los linfocitos T autoreactivos que escapan de la selección negativa del timo y acceden a la periferia como células *naïve*, expresan el IL-7Rα en su membrana y responden del mismo modo que el resto de linfocitos a las señales de supervivencia generadas por la IL-7.

No únicamente los linfocitos responden a IL-7. Los monocitos humanos responden a IL-7 segregando citoquinas proinflamatorias (Alderson et al., 1991) y las DCs requieren la señalización a través del IL-7Rα para completar su desarrollo (Guimond et al., 2009). También se ha comprobado que las células inductoras de tejidos linfoides o *lymphoid tissue inducer cells* (LTi) responden a IL-7. Estas células LTi son las encargadas de favorecer la formación de los tejidos linfoides terciarios

que aparecen en los focos inflamatorios de algunas enfermedades autoinmunes. La IL-7 actúa favoreciendo su supervivencia de un modo similar al que produce sobre los linfocitos T (Meier et al., 2007).

2.5.4. Interleuquina 23

La IL-23 está considerada la citoquina central en la diferenciación de las células T *naïve* hacia células Th17. Se trata de una citoquina de la familia de la IL-12 compuesta por dos cadenas peptídicas de 19 y 40 kDa (p19 y p40, respectivamente) unidas por puentes disulfuro. La subunidad IL-23p19 es específica de la IL-23, mientras que la subunidad p40 (IL-12R β 1), también forma parte de la IL-12 cuando se une a la subunidad específica IL-12p35 (Figura 8).

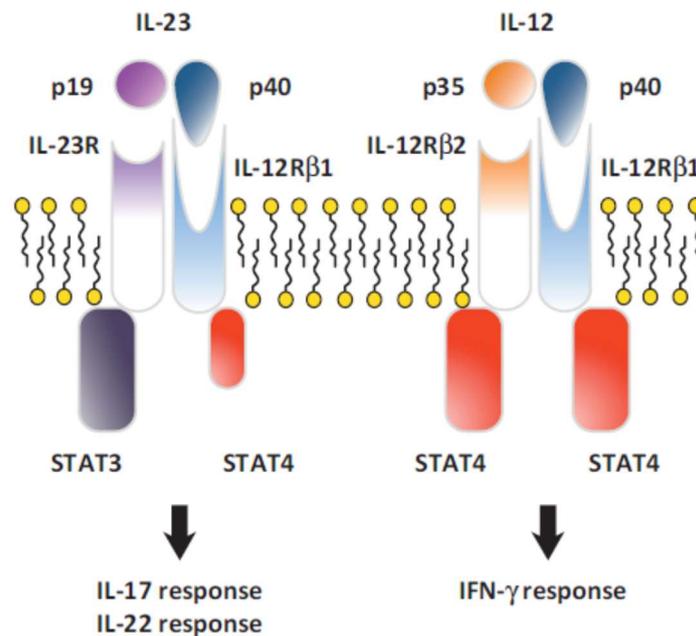


Figura 8. Esquema del complejo IL-23R e IL-12R y sus principales dianas de acción. Fuente: Ngiow et al. A balance of interleukin-12 and -23 in cancer. Trends in Immunology. 2013.

Del mismo modo, cuando la subunidad IL-12R β 1 dimeriza con la subunidad IL-12R β 2, se forma el complejo receptor de IL-12 (Vignali & Kuchroo, 2012). Debido a que tanto la IL-23 como su receptor comparten componentes con IL-12 y su receptor, se tardaron varios años en descubrir que era IL-23 y no IL-12 la citoquina responsable del desarrollo de las células Th17 y su relación con la autoinmunidad (Cua et al., 2003). La señalización a través del IL-23R activa los dominios quinasa de tirosinas presentes en la región intracelular de los receptores generando un lugar de unión a Jak2 para fosforilar y activar MAPK, PI3K, STAT3 y, en menor medida, STAT1, STAT4 y STAT5 (Floss et al., 2013; Parham et al., 2002).

La IL-23 actúa sinérgicamente con IL-6 en la potenciación, diferenciación, supervivencia y estabilidad de los linfocitos Th17. Se ha podido demostrar que la combinación de TGF- β con IL-6/IL-21 induce la aparición del IL-23R en la superficie de las células Th17 en diferenciación. De esta manera, la acción de la IL-23 sobre su receptor activa la señalización que actúa facilitando la diferenciación terminal de las células Th17 y favoreciendo su supervivencia una vez diferenciadas (McGeachy et al., 2009; Zhou et al., 2007). La deficiencia de IL-23, o al menos de la subunidad p19, está claramente asociada al descenso de las células Th17 *in vivo*.

2.5.5. Papel de las células Th17 en la inflamación y en la patología autoinmune

Una vez han alcanzado su estado diferenciado, las células Th17 adquieren su capacidad efectora contra patógenos extracelulares. La principal característica de las células Th17 es su capacidad de secreción de citoquinas proinflamatorias que actuarán sobre multitud de tipos celulares con el objetivo de crear un foco inflamatorio capaz de eliminar estos parásitos. Un gran número de tipos celulares presentan receptor de IL-17 en su membrana, tales como células del sistema inmune, células epiteliales o fibroblastos entre otras. Cuando el receptor de la IL-17 se activa, se desencadena, además, la producción de otras citoquinas inflamatorias como IL-1 β , IL-6, el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y el factor

estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Al mismo tiempo, se secretan quimiocinas del tipo CXCL8, CCL3 o CCL2 que reclutarán células inmunes al foco de inflamación, principalmente neutrófilos, pero también macrófagos y otros linfocitos (Ambrosi et al., 2012; Gaffen, 2008).

La IL-17 también favorece la formación del foco inflamatorio a través de acciones sobre el endotelio vascular. De manera fisiológica, las células endoteliales presentan receptores de IL-17 que, cuando se activan, inhiben las proteínas formadoras de las *tight junctions* aumentando la permeabilidad al paso de células del torrente sanguíneo al parénquima (Kebir et al., 2007) (Figura 9).

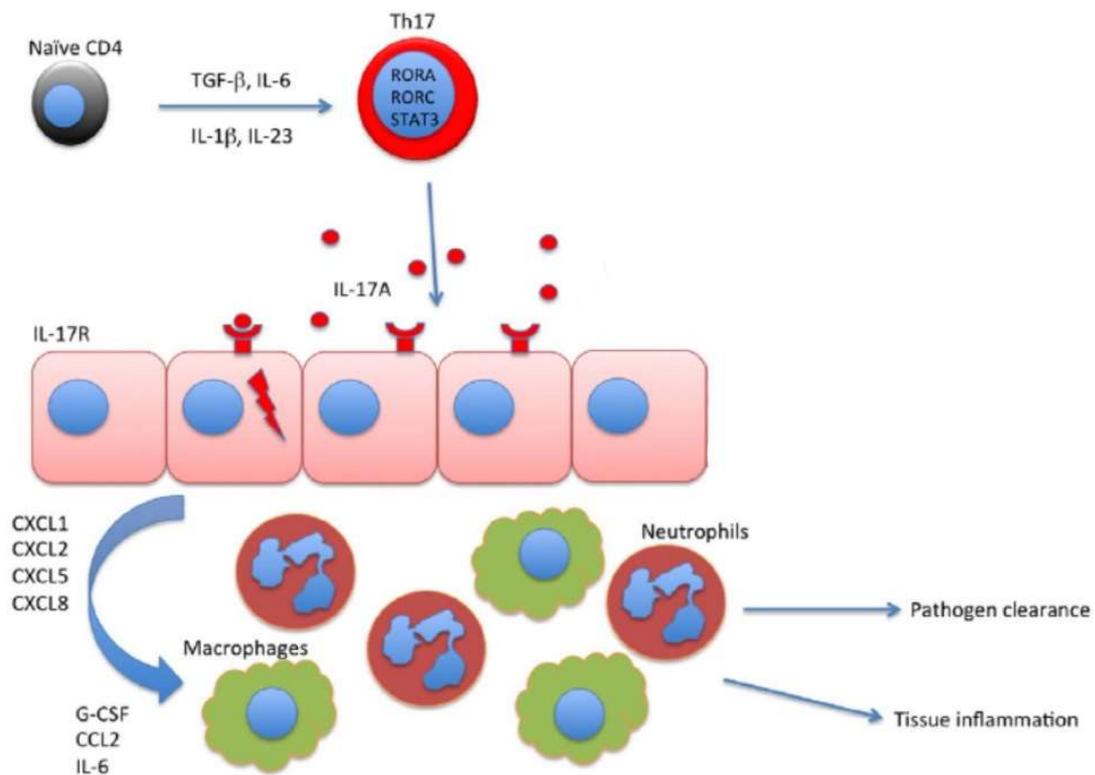


Figura 9. Papel de la IL-17 en los procesos de inflamación tisular. Adaptado de: Chen & Kolls. Interleukin-17A (IL17A). Gene. 2017.

Debido a su capacidad para inducir inflamación, las células Th17 no están involucradas únicamente en la eliminación de patógenos extracelulares. Una

desregulación en el sistema Th17 acaba produciendo inflamación crónica ya sea porque no aparecen mecanismos que detengan la respuesta o por un exceso de señales que la activen. En el caso de las enfermedades autoinmunes, la generación de células Th17 se produce por la existencia, principalmente, de células T *naïve* autoreactivas. Éstas, tras activarse, migran al lugar donde está presente el autoantígeno formando un foco inflamatorio que, debido a que el autoantígeno no desaparece, se acaba volviendo crónico. De este modo, la destrucción tisular normal producida por las células Th17 que se produce en casos de infecciones bacterianas, puede acabar provocando patología en casos de enfermedades autoinmunes.

2.6. Inmunopatogenia de la esclerosis múltiple

Una de las cuestiones que todavía no están claras en la EM es el lugar donde se inicia la respuesta autoinmune. Actualmente existen diferentes hipótesis al respecto: el modelo extrínseco que propone que la respuesta inmune se produce en la periferia mientras que el modelo intrínseco propone que se produce en el propio SNC. Según el modelo extrínseco, las células T autoreactivas son activadas por sus antígenos correspondientes en la periferia por mimetismo molecular de manera que se trasladan al SNC junto con linfocitos B activados y monocitos (Harkiolaki et al., 2009). El modelo de EAE, utilizado para el estudio de la EM, se basa en un mecanismo de activación extrínseca, pues se induce la autoinmunidad mediante la administración de antígenos propios del SNC junto con estimulantes del sistema inmune a nivel periférico. Una vez activadas las células autoreactivas, se generan células Th1 y Th17 en los ganglios linfáticos que entrarán en la circulación para ejercer sus funciones efectoras en el SNC una vez hayan atravesado la barrera hematoencefálica (BHE).

Por otro lado, según el modelo de activación intrínseca al SNC, el desarrollo de la EM empezaría dentro del SNC mientras que la posterior infiltración de linfocitos autoreactivos sería un fenómeno secundario. No obstante, no está claro qué tipo

de eventos podrían conducir a una activación intrínseca en el SNC en el caso de la EM, aunque se ha postulado que podría tratarse de algún virus todavía desconocido o algún tipo de proceso que produzca neurodegeneración primaria similar a los mecanismos implicados en las enfermedades de Alzheimer o Parkinson.

A pesar de no estar claro cómo se inicia, ni el desarrollo exacto de las enfermedades autoinmunes, los procesos de neurodegeneración y desmielinización presentes la EM parecen estar causados por la activación crónica de células autoreactivas y la pérdida de células reguladoras (Balandina et al., 2005; Chi et al., 2007; Sie et al., 2014; Sugiyama et al., 2005).

2.6.1. Autoantígenos

Tradicionalmente, los componentes de la mielina han sido reconocidos como los principales antígenos involucrados en la activación de linfocitos y de la respuesta autoinmune en la EM (Tabla 4). El principal y más estudiado es la proteína básica de la mielina (MBP). Se ha demostrado que el fragmento peptídico MBP₈₉₋₉₉ es capaz de ser reconocido por diferentes alelos HLA de clase II (de Graaf et al., 1999).

A parte de la MBP, la proteína proteolipídica (PLP) y la glicoproteína oligodendrocítica de la mielina (MOG) también se han descrito como autoantígenos en pacientes al haberse encontrado anticuerpos específicos frente a estas proteínas (Mayer & Meinl, 2012). Por otro lado, se han propuesto como autoantígenos capaces de activar linfocitos T CD4+ otros componentes de la mielina como la glicoproteína asociada de la mielina (MAG) o la 2',3'-cyclic-nucleotide 3' -phosphodiesterase (Muraro et al., 2002; Rosener et al., 1997).

Tabla 4. Principales autoantígenos demostrados en la EM.

AUTOANTÍGENOS	REFERENCIA
Autoantígenos proteicos	
Myelin basic protein (MBP)	Einstein et al., 1962; Laatsch et al., 1962
Myelin oligodendrocyte protein (MOG)	Lebar et al., 1986
Myelin proteolipid protein (PLP)	Tuohy et al., 1988
2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (2',3'-CNP)	Maatta et al., 1998
Neurofascin-155 (NF-155)	Charles et al., 2002; Mathey et al., 2007
Neurofascin-186 (NF-186)	Hedstrom et al., 2007
Neurofilament-M (NF-M)	Krishnamoorthy et al., 2009
Contactin-2	Derfuss et al., 2009
Calcium-binding protein β (S100 β)	Kojima et al., 1997
Aquaporin-4 (AQP4)	Muraro et al., 2002; Rosener et al., 1997
Autoantígenos lipídicos	
Phosphatidylserine	Ohler et al., 2004
Sulfatides	Kanter et al., 2006
Oxidized phosphatidylcholine	Qin et al., 2007
Ganglioside GM1, sulfatide and galactosylceramide	Shamshiev et al., 1999
Gangliosides GM3 and GQ1b	Pender et al., 2003
Ganglioside GD1a	Mata et al., 1999
Lactosylceramide and L- α -lysophosphatidylserine	Kanter et al., 2006; Quintana et al., 2008

Adaptado de: Mix et al., Animal models of multiple sclerosis--potentials and limitations. Progress in Neurobiology. 2010.

2.6.2. Células T autoreactivas

Durante los primeros estadios de la EM, ya pueden observarse células T en las lesiones del SNC. Se hipotetiza que antígenos procedentes del SNC podrían ser liberados a la periferia donde serían presentados por las APCs a los linfocitos

autoreactivos para su activación (Ji et al., 2013; McMahon et al., 2005). Una vez activados en los ganglios linfáticos, los linfocitos autoreactivos migrarían a través del torrente sanguíneo hasta el SNC donde accederían para ejercer su capacidad efectora. En estudios en el modelo de EAE, los linfocitos T CD4+ presentes en el SNC se reactivan por APCs incluyendo DCs CD11c+ lo que provoca el reclutamiento de monocitos al SNC y produce una respuesta inflamatoria (McMahon et al., 2005). Las células Th1 y Th17 son las principales poblaciones de linfocitos T CD4+ implicadas en la EM. No obstante, se desconoce exactamente la importancia relativa y el papel de cada una en la patogenia de la enfermedad. Así, un ensayo clínico de fase II con pacientes con EM recurrente-remitente no obtuvo conclusiones tras administrar ustekinumab, un anticuerpo capaz de reconocer la p40, una subunidad común en las citoquinas IL-12 (Th1) e IL-23 (Th17) (Segal et al., 2008). Se hipotetiza que, el fármaco podría no atravesar la BHE y, por tanto, no producir el efecto deseado, o bien que tal vez tanto la IL-12 como la IL-23 no jugarían un papel importante en etapas avanzadas de la patogenia de la EM. En cualquier caso, los resultados del ensayo condujeron a cuestionar los modelos animales utilizados para el estudio de la EM. Aunque el modelo de EAE resulta indispensable para el estudio de la EM, su patogenia y la aplicación de nuevos fármacos, hay que tener en cuenta que humanos y ratones presentan diferencias interespecies notables en cuanto al sistema inmune se refiere. Por ejemplo, la IL-23 resulta indispensable para la inducción de las células Th17 en ratones. No obstante, al parecer, no lo es en humanos (Ghoreschi et al., 2010; Zielinski et al., 2012). Por otro lado, se ha observado que el GM-CSF, el cual contribuye a la inflamación crónica, se produce principalmente en células Th17 en ratones (Codarri et al., 2011), mientras que en humanos, el principal productor son las células Th1 (Noster et al., 2014).

Además, en la EM las células T CD8+ se han encontrado en la sustancia blanca y en las lesiones corticales desmielinizantes de la sustancia gris con mayor frecuencia que las células T CD4+, correlacionándose además su número con el daño axonal (Frischer et al., 2009). En pacientes de EM, aproximadamente la cuarta parte de las células T CD8+ en las lesiones activas producen IL-17, las cuales forman la

subpoblación denominada células T invariantes asociadas a mucosa (MAIT) (Willing et al., 2014). Esta subpoblación de células T CD8+ se encuentra enriquecida en regiones próximas a mucosas y está caracterizada por expresar una forma semi-invariable del receptor T restringido por moléculas HLA de clase Ib altamente conservado. A pesar del peso específico de las células T CD8+ en la patogenia de la EM, así como de los numerosos estudios y los ensayos con fármacos capaces de actuar tanto sobre células T CD4+ como T CD8+, en la actualidad el papel de las células T CD8+ aún no está claro.

2.6.3. Células B autoreactivas

Las células B pueden encontrarse en las meninges, en el parénquima cerebral y en el LCR durante la progresión de la enfermedad; y la producción de anticuerpos detectables en el LCR tiene valor diagnóstico (Housley et al., 2015). El número de células plasmáticas productoras de anticuerpos aumenta con la edad en pacientes con EM y, a menudo, se observan estructuras linfoides terciarias en las meninges de pacientes con formas progresivas de la enfermedad (Howell et al., 2011). Estas estructuras linfoides terciarias están formadas por agregados de células plasmáticas, células B, células T y células dendríticas foliculares y son propias de procesos inflamatorios crónicos o enfermedades infecciosas.

Aunque se desconocen los mecanismos por los cuales se produce la activación y maduración de las células B autoreactivas, estudios recientes han demostrado que la exposición a los autoantígenos y su maduración se podría producir en los ganglios linfáticos cervicales para posteriormente migrar al SNC (Palanichamy et al., 2014; Stern et al., 2014). Tras diferentes ensayos clínicos se demostró que los anticuerpos monoclonales anti-CD20 como el ocrelizumab (Kappos et al., 2011) o el rituximab (Hauser et al., 2008) son capaces de reducir la tasa de brotes en pacientes con EM convirtiendo esta terapia en una de las opciones aprobadas para la EM.

2.6.4. Células T reguladoras

Los linfocitos Treg (Foxp3^+), son una subpoblación de linfocitos con funciones homeostáticas (Figura 9). Actúan inhibiendo la respuesta inmune garantizando el retorno a la homeostasis. Además, juegan un papel clave en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica. Se generan principalmente en el timo desde donde migran a los correspondientes órganos para ejercer sus funciones efectoras (Fontenot et al., 2003).

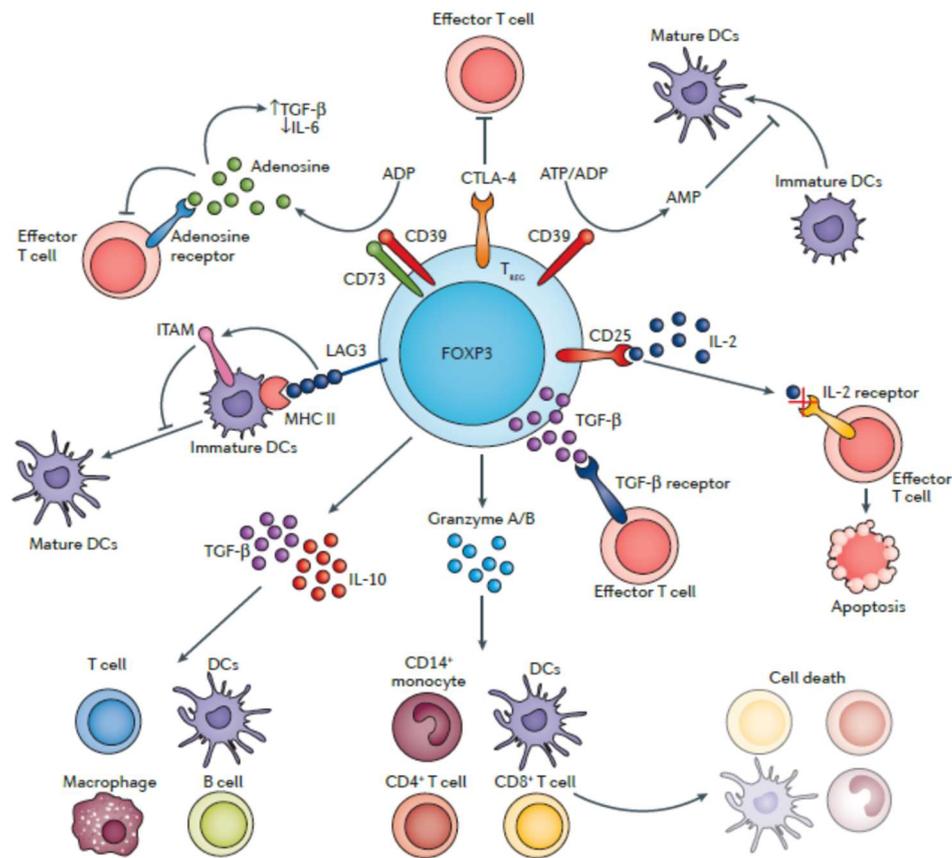


Figura 9. Mecanismos inmunosupresores ejercidos por las células Treg y las principales vías implicadas. CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4); DC (Dendritic cell); ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif; LAG3 (Lymphocyte activation gene 3); MHC (Major histocompatibility complex; TGF (Transforming growth factor). Fuente: Meng et al., Regulatory T cells in cardiovascular diseases. Nature Reviews. Cardiology. 2016.

Se ha observado en diferentes estudios una reducción del número y/o la capacidad supresora de las células Treg en la periferia de pacientes con EM respecto a controles (Fletcher et al., 2009; Venken et al., 2008). Gracias a diferentes estudios

con modelos animales, se ha podido comprobar que la supresión de las células Treg inhibe la recuperación espontánea de la EAE. No obstante, durante la EAE se producen rápidamente células Treg que migran al SNC, pero éstas resultan incapaces de suprimir la respuesta generada por las células T efectoras posiblemente debido a que sean resistentes a la acción de las Treg (Korn et al., 2007; McGeachy et al., 2005; O'Connor et al., 2007).

Por el contrario, la administración de autoantígenos del SNC en un contexto no inflamatorio es capaz de prevenir el desarrollo de la EAE debido a la generación de tolerancia inmunológica a través de mediadores solubles como IL-10, IL-35 y TGF- β o moléculas de superficie como CD25 y CTLA-4 (Collison et al., 2010; Kennedy et al., 1990; Takahashi et al., 2000).

2.6.5. Migración de las células inmunes al SNC y formación del foco inflamatorio

La sintomatología neurológica observada en la EM se debe a las áreas de inflamación, desmielinización y a la pérdida axonal. El SNC se considera un órgano inmunológicamente privilegiado donde el acceso de las células del sistema inmune circulantes se produce a través del endotelio del plexus coroides al LCR y de éste al parénquima cerebral de una manera altamente regulada (Kivisakk et al., 2003; Ransohoff & Engelhardt, 2012). En condiciones fisiológicas, el paso de células del sistema inmune a través de la BHE es mínimo.

Una vez las células T CD4+ autoreactivas se activan y generan células Th17, adquieren la capacidad de atravesar la BHE donde secretarán citoquinas capaces de reclutar las células que generarán el foco inflamatorio. Para que cualquier célula del sistema inmune migre desde su punto de origen a cualquier punto del organismo, son necesarias señales de quimiotaxis a través de quimiocinas y sus receptores. En el caso de la atracción de las células Th17 al SNC, se ha comprobado que la quimiotaxis se produce a través de la quimiocina CCL20 y su receptor CCR6 (Arima et al., 2012; Reboldi et al., 2009).

Tras activarse, las células Th17 expresan el receptor CCR6 en su membrana, el cual es capaz de interactuar con el ligando CCL20 secretado constitutivamente por las células del endotelio vascular de la BHE (Reboldi et al., 2009). De esta manera, las células Th17 son capaces de llegar al compartimento encefálico. Una vez en el parénquima cerebral, secretan citoquinas proinflamatorias entre las cuales se encuentra la IL-17A. Entre otras funciones, IL-17A actúa inhibiendo las proteínas que forman las uniones estrechas o *tight junctions* aumentando la permeabilidad de la BHE favoreciendo, así, la migración de células del sistema inmune al SNC y el paso de moléculas proinflamatorias solubles (Kebir et al., 2007).

El primer paso para la extravasación se produce mediante moléculas tipo P-selectinas que permiten la adhesión al endotelio y la extravasación de algunas células al LCR o al parénquima cerebral. Además, en condiciones de infección o patológicas como en el caso de la EM, determinadas citoquinas inducen la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de las células endoteliales como VCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule-1*) o ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular-1) produciendo la segunda interacción necesaria para el paso de las células de la periferia al SNC a través del espacio subaracnoideo. Los linfocitos circulantes expresan la integrina $\alpha 4\beta 1$ (también denominada *Very Late Antigen-4* o VLA-4) que interactúa con las moléculas VCAM-1 de las células endoteliales facilitando la diapédesis y el paso al SNC. El anticuerpo natalizumab que reconoce la integrina $\alpha 4\beta 1$ ha sido capaz de reducir la inflamación en pacientes con EM demostrando así la relevancia en la patogenia de la EM de las moléculas de adhesión implicadas en el trasvase celular (Engelhardt & Briskin, 2005; Yednock et al., 1992).

2.6.6. Neurodegeneración asociada a la inflamación crónica del SNC

La mayoría de terapias orientadas a la inmunomodulación han demostrado reducir tanto el número como la severidad de los brotes. No obstante, ninguna terapia actual ha sido capaz de detener la progresión de la EM a largo plazo. Se ha sugerido

que las respuestas autoinmunes inician la enfermedad y facilitan un proceso de neurodegeneración crónica donde no es necesaria la infiltración continuada de células periféricas del sistema inmune. Tras la activación de las células autoreactivas, se forman estructuras linfoides terciarias en el SNC que producen mediadores inflamatorios capaces de actuar sobre células propias del SNC como los astrocitos o la microglía. Así, la inflamación produciría estrés oxidativo, deficiencias energéticas, desequilibrios iónicos y un desajuste en los mecanismos de neuroprotección del SNC sobre células residentes del SNC dando lugar, así, a la pérdida axonal en la EM (Friese et al., 2014) (Figura 10).

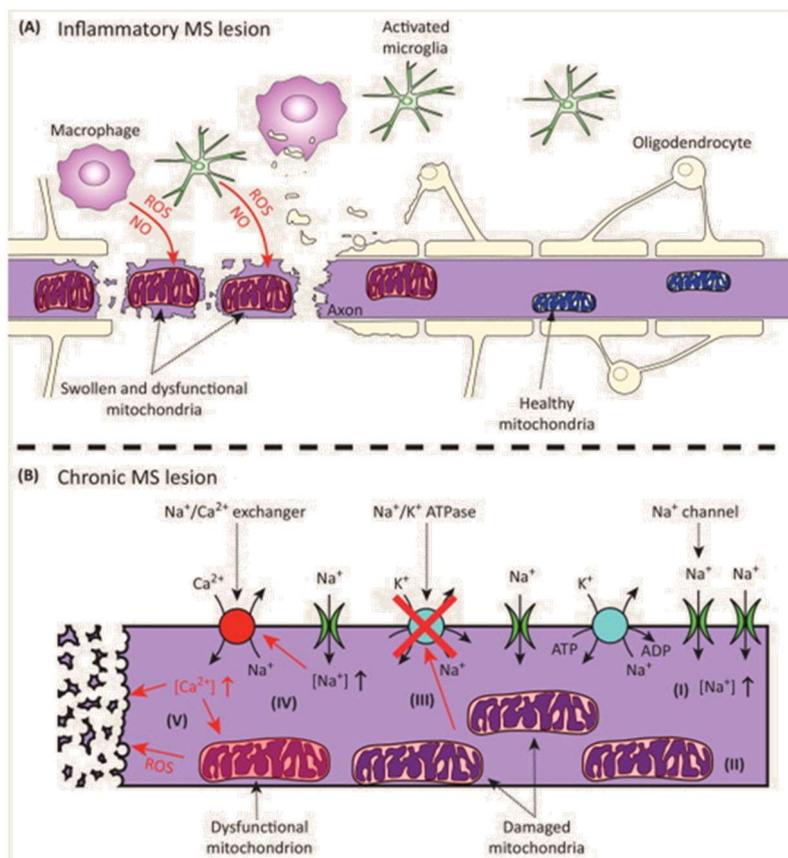


Figura 10. Mecanismos de destrucción de la mielina durante los periodos activos de la EM (A) y durante los periodos de neurodegeneración crónica (B). Fuente: Witte et al., Mitochondrial dysfunction contributes to neurodegeneration in multiple sclerosis. Trends in Molecular Medicine. 2014.

2.7. Tratamientos actuales de la esclerosis múltiple

En la actualidad, al igual que ocurre con otras enfermedades autoinmunes, la EM no tiene cura, por lo que los tratamientos se enfocan en detener el avance de la enfermedad, a tratar la sintomatología o a potenciar la rehabilitación funcional (Dargahi et al., 2017).

En la EM se diferencian claramente los periodos activos de los periodos de remisión donde los eventos que ocurren en las dos etapas son claramente diferenciados. Durante los brotes, el tratamiento es sintomático y se encamina a la eliminación del brote. Por el contrario, durante los periodos de no actividad, el tratamiento a realizar está destinado a modificar la historia natural de la enfermedad para evitar nuevos brotes y la cronicidad de las lesiones (Tabla 5).

Dado el carácter inflamatorio de las lesiones en la EM, los corticoides a dosis altas forman parte del tratamiento de elección durante los brotes. Además de los corticoides, en casos graves sin respuesta a estos, se pueden utilizar inmunoglobulinas intravenosas o la plasmaféresis.

Por otro lado, los tratamientos de fondo están orientados a modificar la historia natural de la enfermedad. La mayoría de los tratamientos actuales tienen base inmunológica y su objetivo es la prevención de nuevos brotes y su intensidad, la prevención de nuevas lesiones observables por resonancia magnética y retrasar o reducir las incapacidades producidas por la enfermedad.

En 2020, en España hay 14 tratamientos aprobados para la EM: cinco IFN β (Betaferon®, Extavia®, Avonex®, Rebif®, Plegridy®), acetato de glatirámico (Copaxone®), cladribina (Mavenclad®), mitoxantrona (Novantrone®), natalizumab (Tysabri®), fingolimod (Gilenya®), teriflunomida (Aubagio®), BG-12/dimetilfumarato (Tecfidera®), alemtuzumab (Lemtrada®) y ocrelizumab (Ocrevus®).

Tabla 5. Tratamientos aceptados para la EM.

PRINCIPIO ACTIVO	NOMBRE COMERCIAL	LABORATORIO TITULAR	AÑO APROBACIÓN (EMA)	MODO ADMINISTRACIÓN	FRECUENCIA ADMINISTRACIÓN	MECANISMO DE ACCIÓN
Acetato de glatirámero (en genérico desde 2016)	Copaxone® 20 o 40	Teva Pharmaceuticals Ltd	2002	Subcutáneo	Cada día o 3 veces por semana	Bloquea presentación del MHC
Alemtuzumab	Lemtrada®	Genzyme Therapeutics Ltd	2013	Intravenoso	Ciclos de 5 o 3 días anuales	Ab monoclonal anti-CD52. Induce apoptosis de linfocitos en la periferia
Cladribina	Mavenclad®	Merk	2017	Oral	Dos cursos de tratamiento a lo largo de dos años	Bloquea la capacidad proliferativa de los linfocitos
Dimetilfumarato	Tecfidera®	Biogen Idec Limited	2014	Oral	Dos veces/día	Efecto antiinflamatorio y antiestrés oxidativo
Fingolimod	Gilenya®	Novartis Europharm Ltd	2011	Oral	Cada día	Antagoniza el receptor de esfingosina-1-phosphate. Disminuye células T y B activadas en el SNC
Interferón beta-1a	Avonex®	Biogen Idec Limited	1997	Intramuscular	Una vez/semana	Secreción de citoquinas antiinflamatorias. Disminuye células Th17 e IL-17
Interferón beta-1a	Rebif®	Merck Serono Europe Ltd	1998	Subcutáneo	Tres veces/semana	
Interferón beta-1a pegilado	Plegridy®	Biogen Idec Limited	2014	Subcutáneo	Cada 2 semanas	
Interferón beta-1b	Betaferon®	Bayer Pharma Ag	1995	Subcutáneo	Cada dos días	
Interferón beta-1b	Extavia®	Novartis Europharm Ltd	2008	Subcutáneo	Cada dos días	
Mitoxantrona (en genérico desde 2006)	Novantrone®	Meda Pharma, S.A.U.	1998	Intravenoso	Frecuencia variable. Dosis máxima acumulada: 140 mg/m2	Inmunosupresor. Induce apoptosis de células proliferantes
Natalizumab	Tysabri®	Biogen Idec Limited	2006	Intravenoso	Cada 4 semanas	Ab monoclonal anti-integrina α4. Bloquea migración de los linfocitos
Ocrelizumab	Ocrevus®	Roche	2019	Intravenoso	Cada 6 meses	Ab monoclonal anti-CD20. Depleciona linfocitos B
Teriflunomida	Aubagio®	Sanofi-Aventis Groupe	2013	Oral	Una vez/día	Inhibe la dihidroorotato deshidrogenasa. Bloquea la proliferación de células B y T

Adaptado de www.esclerosismultiple.com; Dargahi et al., Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update. Brain Sciences. 2017 y Tintore et al., Treatment of multiple sclerosis— success from bench to bedside Nature. Reviews Neurology. 2019.

Gracias a los avances en el conocimiento de la patogenia de la EM y otras enfermedades autoinmunes, se están llevando a cabo multitud de estudios para encontrar nuevas terapias capaces de detener el avance de la enfermedad, ya sea solas o en combinación con otras ya existentes. Actualmente se dispone de una gran cantidad de anticuerpos monoclonales capaces de reconocer específicamente la mayoría de las moléculas involucradas y, muchos de ellos, se están probando o han sido probados tanto en EM como en otras enfermedades de carácter autoinmune.

2.8. Estrategias terapéuticas para enfermedades autoinmunes

El balance entre las células patogénicas y las células reguladoras se ha estudiado con el objetivo de diseñar terapias que reestablezcan el equilibrio normal de las dos respuestas en las enfermedades autoinmunes. De este modo, muchas de las nuevas estrategias terapéuticas se basan en la inhibición de las respuestas Th17 y/o la promoción de las respuestas Treg. Debido a ello, se han desarrollado diversos anticuerpos monoclonales direccionados contra citoquinas efectoras de las células Th17, así como contra receptores específicos para bloquear el desarrollo o la activación de estas células (Tabla 6).

Algunas de estas terapias han demostrado efecto sobre determinadas enfermedades mientras que no han resultado efectivas sobre otras, demostrando que es necesario desarrollar estrategias terapéuticas específicas para cada una de las enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, se ha observado que el bloqueo de las vías de IL-6 o TNF- α mediante anticuerpos específicos contra el receptor de IL-6 (Narazaki et al., 2017) o contra el TNF- α resulta beneficioso en el caso de la artritis reumatoide (Alfonso-Cristancho et al., 2017). En cambio, han fracasado en el caso de la EM. El anticuerpo ustekinumab contra la subunidad p40 común para la IL-12 y la IL-23 ha resultado efectivo para la psoriasis. Sin embargo, tampoco ha dado resultados positivos para el tratamiento de la EM (Segal et al., 2008).

Tabla 6. Anticuerpos contra diferentes elementos de la vía de Th17 utilizados en ensayos clínicos de diferentes enfermedades autoinmunes.

NOMBRE	FABRICANTE	DIANA	TIPO MOLÉCULA	ENFERMEDAD	FASE CLÍNICA
Ustekinumab	Janssen	p40 (IL-12 e IL-23)	Anticuerpo monoclonal	Artritis reumatoide	Fase II
				Enfermedad de Crohn	Fase III
Secukinumab	Novartis	IL-17A	Anticuerpo monoclonal	Artritis Psoriasica	Fase III
				Artritis reumatoide	Fase III
				Espondilitis anquilosante	Fase III
				Esclerosis Múltiple	Fase II
Ixekizumab	Eli Lilly	IL-17A	Anticuerpo monoclonal	Asma	Fase II
				Psoriasis	Fase III
				Artritis Psoriasica	Fase III
Brodalumab	Amgen/ AstraZeneca	IL-17RA	Anticuerpo monoclonal	Artritis reumatoide	Fase II
				Psoriasis	Fase III
				Artritis Psoriasica	Fase III
Tildrakizumab	Merck/ Sun Pharma	p19 (IL-23)	Anticuerpo monoclonal	Psoriasis	Fase III
Guselkumab	Janssen	p19 (IL-23)	Anticuerpo monoclonal	Psoriasis	Fase III
				Artritis reumatoide	Fase II
ABT-122	AbbVie	IL-17A y TNF- α	Inmunoglobulina dual	Artritis reumatoide	Fase II
Mavrilimumab	MedImmune	GM-CSFR	Anticuerpo monoclonal	Artritis reumatoide	Fase II
GSK3196165	MorphoSys AG and GlaxoSmithKline	GM-CSF	Anticuerpo monoclonal	Artritis reumatoide	Fase II
				Esclerosis Múltiple	Fase Ib

Adaptado de: Bartlett & Million. Targeting the IL-17-T(H)17 pathway. Nature Reviews. Drug Discovery. 2015 y Hamilton et al., Anti-colony-stimulating factor therapies for inflammatory and autoimmune diseases. Nature Reviews. Drug Discovery. 2016.

La EM como enfermedad autoinmune presenta una particularidad que la diferencia del resto para su tratamiento, pues el órgano diana es el SNC que se encuentra protegido por la BHE. Esta característica se cree que es una de las responsables del fracaso de muchas moléculas potencialmente terapéuticas que sí habían funcionado en otras enfermedades como por ejemplo la psoriasis o la artritis reumatoide. De hecho, si se analiza la naturaleza de las moléculas aceptadas en la actualidad como tratamientos estándar para la EM, se puede observar que todas producen su efecto fuera del SNC. Así, considerando que el acceso al SNC se encuentra limitado, las estrategias actuales se centran, en su mayoría, en el bloqueo de aquellas fases que ocurren previas a la entrada de las células al propio SNC o, en el caso del natalizumab, al bloqueo de la entrada.

Gracias a los estudios anteriores, se han generado diferentes estrategias destinadas ya no al bloqueo de la diferenciación y generación de células Th17 si no al bloqueo de factores que interfieran en su mantenimiento o en su capacidad efectora. Así, se han generado diferentes anticuerpos destinados al bloqueo de IL-17 o GM-CSF para reducir el efecto proinflamatorio generado por las células Th17 maduras. Por otro lado, se han generado, también, anticuerpos bien contra la subunidad CD25 del IL-2R bien contra IL-7R para interferir sobre la viabilidad de las propias Th17 maduras. Estos dos receptores, que habían sido previamente identificados como genes de susceptibilidad para EM, juegan un papel claro en la supervivencia y expansión de células Th1 y Th17. Además, en el caso del bloqueo de IL-7, se ha observado que las células Treg presentan una cantidad muy baja de receptor de IL-7 en su membrana de manera que el bloqueo de la IL-7 no afectaría a la supervivencia de las células Treg lo cual podría resultar más efectivo para el tratamiento de diferentes enfermedades autoinmunes (Amadi-Obi et al., 2007; Hartigan-O'Connor et al., 2007; Liu et al., 2010).

Debido a que muchos de los receptores presentes en las células Th17, también lo están en otras poblaciones celulares, cualquier actuación sobre una vía afecta a múltiples tipos celulares. Es debido a esto que algunas terapias no funcionan *in vivo* o presentan efectos indeseados. En este sentido, el factor de transcripción ROR γ t representa la diana interesante para la manipulación de las células Th17 ya que se

expresa únicamente en células Th17 activadas. La digoxina, una pequeña molécula que se une a ROR γ t e interfiere sobre su transcripción ha demostrado ser capaz de inhibir la diferenciación de células Th17 en ratón y reducir la severidad de la EAE (Huh et al., 2011). Un efecto similar produce el ácido ursólico o la molécula sintética SR1001 (Huh et al., 2011; Solt et al., 2011; Xu et al., 2011) (Figura 11).

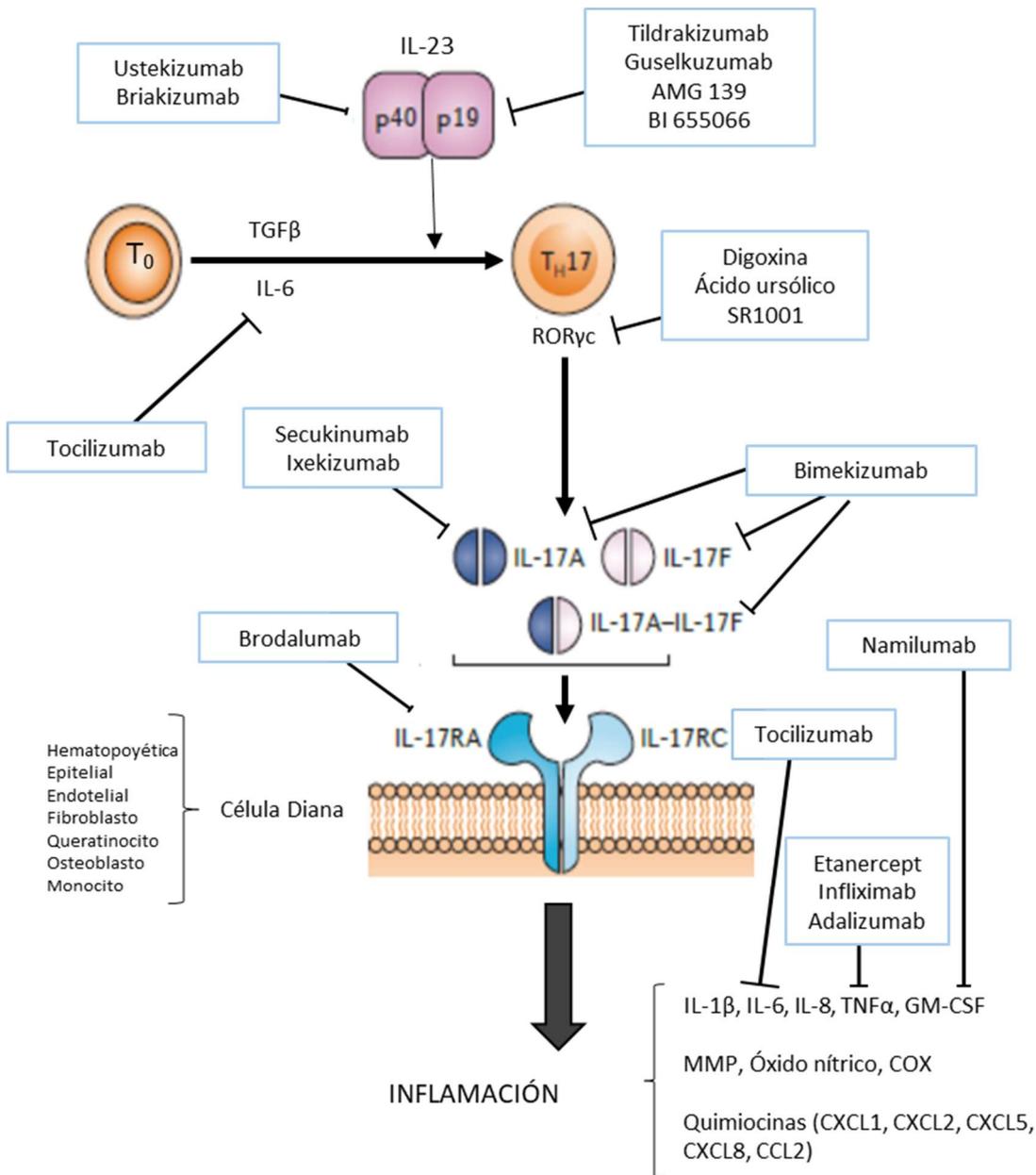


Figura 11. Tratamientos y sus respectivas dianas de la vía de Th17 en diferentes fases de ensayos clínicos para el tratamiento de la EM. Adaptado de: Bartlett & Million. Targeting the IL-17-T(H)17 pathway. Nature Reviews Drug Discovery. 2015.

3. MODELOS ANIMALES PARA LA INVESTIGACIÓN PRECLÍNICA DE LA EM

3.1. Encefalomiелitis autoinmune experimental

La EAE es una enfermedad autoinmune experimental que se induce en animales de laboratorio mediante la administración de autoantígenos del SNC capaces de producir una reacción autoinmune que provoca inflamación y desmielinización en el SNC (Tabla 7). Se trata del modelo más utilizado para estudiar la EM ya que reproduce muchas de las características clínicas, neuropatológicas e inmunológicas que ocurren en los pacientes (Moreno et al., 2012). Es uno de los modelos más antiguos de enfermedad humana, que proviene originalmente de estudios realizados por Pasteur sobre la vacuna de la rabia con homogenados de médula espinal de conejos a finales del siglo XIX (Baxter, 2007).

En términos generales, la EAE puede presentarse de manera monofásica (aguda), crónica o remitente-recurrente. La EAE aguda se caracteriza por la aparición de un único episodio clínico, mientras que el tipo recurrente-remitente se caracteriza por dos o más brotes y, normalmente, alcanza un estado crónico. El tipo de presentación clínica dependerá del tipo de antígeno utilizado, así como de la especie y la cepa utilizada.

El modelo puede ser inducido en una gran variedad de especies incluyendo rata, ratón, conejo o primates. La EAE se puede inducir mediante inmunización activa o mediante transferencia pasiva.

3.1.1. EAE activa

La enfermedad se induce a través de la administración de antígenos del SNC conjuntamente con adyuvantes. En este modelo, la fase inductora y la fase efectora de la EAE se producen en el mismo animal. En la fase inductora, las células autoreactivas se activan y proliferan en los ganglios linfáticos mientras que,

durante la fase efectora, las células autoreactivas migran al SNC y producen el daño y los signos clínicos de la enfermedad.

Tabla 7. Principales modelos animales para el estudio de la EM y sus principales aplicaciones.

MODELO	MECANISMO	APLICACIÓN	CÉLULAS IMPLICADAS	VALOR TRANSLACIONAL
EAE recurrente-remittente en ratones SJL/J	Inmunización con PLP ₁₃₉₋₁₅₁	Estudio de la neuroinflamación y activación de sistema inmune	T CD4, T CD8, Th17, monocitos, macrófagos, células B, Treg	EM recurrente-remittente, estudio de fases de latencia, ensayo de terapias
EAE crónica ratones C57BL/6J	Inmunización con MOG ₃₅₋₅₅	Estudio de la neuroinflamación y activación de sistema inmune	T CD4, T CD8, Th17, monocitos, macrófagos, células B, Treg	EM primaria progresiva, EM secundariamente progresiva, ensayo de terapias
EAE en ratones transgénicos	Ratón con Células T específicas para MOG ₃₅₋₅₅ o células B con IgH anti MOG	Estudio de la neuroinflamación y activación de sistema inmune	T CD4, T CD8, Th17, monocitos, macrófagos, células B, Treg	Estudio <i>in vivo</i> de la activación y función del sistema inmune
Encefalomiелitis murina de Theiler	Infección con el virus de la encefalomiелitis de Theiler	Estudio del daño axonal y la neuroinflamación	Macrófagos, microglía, oligodendrocitos, astrocitos, T CD4, T CD8	EM primaria progresiva, estudio de las lesiones del SNC y la degeneración axonal
Desmielinización inducida por cuprizona	C57BL/6J con alimentación suplementada con 0,2% de cuprizona durante 6 semanas	Estudio de la desmielinización y la remielinización	Oligodendrocitos, astrocitos, microglía	Ensayo de terapias destinadas a retrasar la desmielinización Y/o acelerar la remielinización
Desmielinización inducida por lisolecitina	Inyección de lisolecitina en ratones SJL/J	Estudio de la desmielinización y la remielinización	Oligodendrocitos, astrocitos, microglía	Ensayo de terapias destinadas a retrasar la desmielinización Y/o acelerar la remielinización

Adaptado de: Procaccini et al., Animal models of Multiple Sclerosis. European Journal of Pharmacology. 2015.

3.1.2. EAE por transferencia pasiva

La inmunización por transferencia pasiva se realiza inyectando linfocitos T autoreactivos frente antígenos mielínicos en animales sanos. En este caso, los

linfocitos se obtienen de bazos y/o ganglios linfáticos de animales inmunizados activamente. A diferencia de la EAE activa, la fase inductora se produce en el primer animal mientras que la fase efectora se produce en el animal receptor.

Actualmente también existen modelos de EAE espontáneos, es decir, que la aparición de los signos clínicos se produce sin necesidad de inducir la enfermedad. Estos modelos consisten en ratones transgénicos que expresan TCRs específicos frente antígenos de la mielina (Radbruch & Isaacs, 2009).

3.2. Otros modelos para el estudio de la esclerosis múltiple

3.2.1. Modelo de encefalitis murina de Theiler

Se conocen diversos virus capaces de inducir desmielinización en animales de laboratorio que se utilizan como modelos para el estudio de enfermedades desmielinizantes. El modelo viral más utilizado es la encefalitis murina por infección con virus de Theiler (Owens, 2006). Se trata de un virus lítico que provoca la liberación de antígenos propios del SNC a la periferia. Estos antígenos se exponen a linfocitos autoreactivos generando así una respuesta contra las proteínas liberadas.

3.2.2. Modelos de desmielinización inducida por toxicidad

Los modelos anteriores se basan en respuestas del sistema inmune y, por tanto, son utilizados para el estudio de los mecanismos de acción implicados en la EM, así como la búsqueda de fármacos destinados a regular el sistema inmune y que éste no ataque al individuo. Por otra parte, existen diversas moléculas capaces de inducir desmielinización del SNC. Los modelos más comunes son los que utilizan la cuprizona y la lisolecitina. En el caso de la cuprizona, ésta actúa sobre los oligodendrocitos maduros induciendo apoptosis con la consecuente desmielinización que comporta (Matsushima & Morell, 2001), mientras que el modelo inducido por lisolecitina genera áreas de desmielinización como efecto

tóxico primario. En ambos casos, la desmielinización induce el reclutamiento y activación de células astrogiales y microglía y sirven principalmente para el estudio de procesos de desmielinización y remielinización (Blakemore & Franklin, 2008).

Una de las principales diferencias con la EM es que en el caso de la EAE se conoce el autoantígeno contra el cual se genera la respuesta autoinmune mientras que en la etiología de la EM intervienen muchos otros factores. En cualquier caso, la investigación mediante los diferentes modelos experimentales ha permitido grandes avances en el conocimiento de la neuroinflamación mediada por células T y ha permitido el desarrollo de varias estrategias terapéuticas para la EM (Friese et al., 2006; Mix et al., 2010; Steinman & Zamvil, 2005).

4. TERAPIA GÉNICA

4.1. Descripción y generalidades

La terapia génica es la introducción de un material genético dentro de una célula o un individuo con el objetivo de curar una enfermedad. La idea de tratar enfermedades humanas mediante la transferencia de un gen terapéutico apareció por primera vez a principios de la década de los 70 de la mano de Friedmann y Roblin (Friedmann & Roblin, 1972). Estos investigadores postularon que se podría aprovechar el hecho de que los virus tienen la capacidad de entrar en las células transportando su material genético y que algunos eran capaces de introducir el material transportado en el genoma del huésped para introducir genes que los individuos no tuvieran o tuvieran mutados con el objetivo de tratar enfermedades. Así, propusieron el uso del virus SV40 como vector para integrar genes para el tratamiento de enfermedades con base genética. El desarrollo de técnicas cada vez más avanzadas para el estudio y manipulación del DNA, así como la secuenciación

del genoma humano, facilitó el estudio de la terapia génica como posible tratamiento real de diferentes enfermedades.

Con la idea de la terapia génica se inicia un nuevo paradigma terapéutico donde el “fármaco” se produce en el interior del paciente a tratar. Además, el hecho de introducir un gen y no una proteína, implicaría que el efecto terapéutico sería constante y no sería necesaria la administración continuada de proteínas terapéuticas.

Con los años, han sido desarrolladas diferentes estrategias para el tratamiento de diferentes enfermedades. Aunque la terapia génica fuera inicialmente ideada para el tratamiento de enfermedades monogénicas donde a nivel teórico se deberían “corregir” todas las células del individuo, rápidamente se observó que determinadas células se transducían con mayor eficiencia en función del vector o la vía de administración y, por tanto, se debería utilizar un vector capaz de llegar al órgano diana específico que se encuentra afectado según la enfermedad a tratar. Además, al restringir el vector al órgano afectado se obtiene un tratamiento más seguro y con menos efectos indeseados.

Actualmente existen numerosos ensayos clínicos que utilizan diferentes estrategias de terapia génica donde un porcentaje muy pequeño corresponde a enfermedades monogénicas (11,7%), mientras que la mayoría de ellos están enfocados al tratamiento del cáncer (66,8%) (Figura 12).

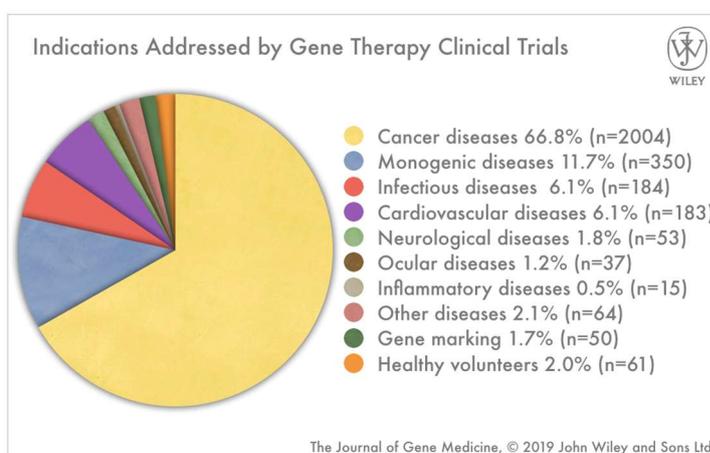


Figura 12. Ensayos clínicos de terapia génica y el tipo de enfermedad a la que van dirigidos. Fuente: <http://www.abedia.com/wiley/indications.php/>.

4.2. Vectores virales

Para que una estrategia de terapia génica resulte eficaz, es necesario identificar el gen terapéutico adecuado, el tejido o células de interés y un vector que sea capaz de liberar el transgén en los tipos celulares diana.

Los vectores en terapia génica son los elementos responsables de la transferencia del material genético. Los vectores se dividen, básicamente, en dos tipos: virales y no virales (Figura 13). *In vivo*, los vectores virales son más eficientes en la transferencia génica que los no virales, pero poseen problemas asociados que pueden limitar su aplicación en terapia génica como la inmunogenicidad. Por contra, los vectores no virales tales como los liposomas o los conjugados de DNA no suelen ser patogénicos pero son menos eficientes en la transferencia génica *in vivo* y presentan grandes limitaciones si se busca un tropismo determinado.

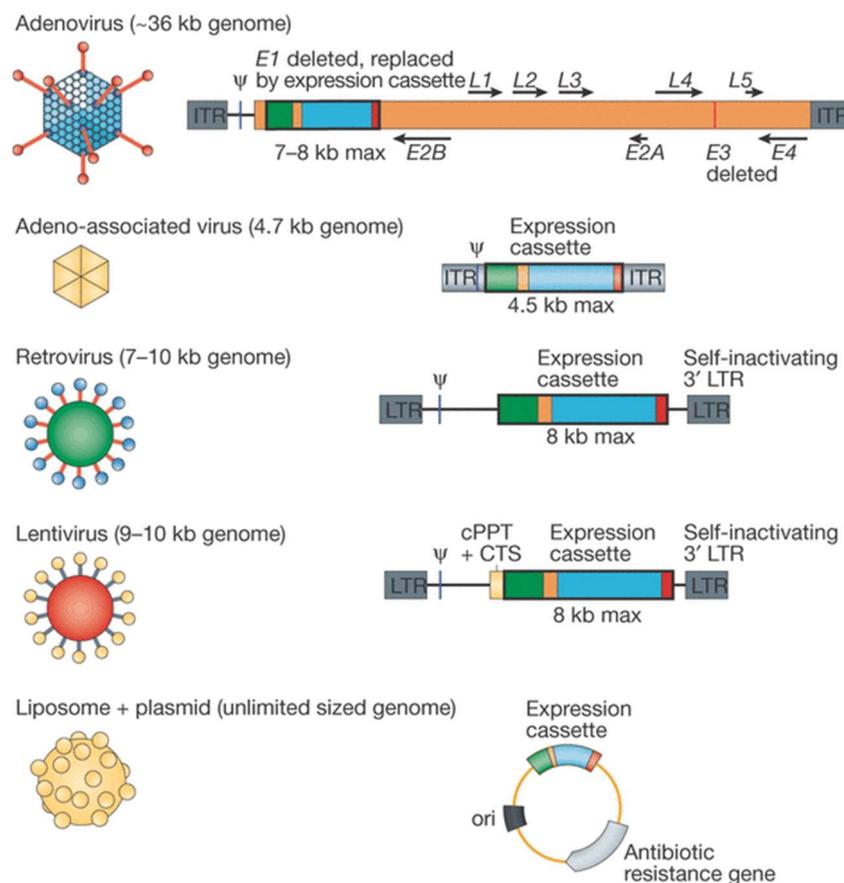


Figura 13. Capacidad de empaquetamiento de los vectores más frecuentes utilizados en terapia génica. Fuente: Sheridan. Gene therapy finds its niche. Nature Biotechnology. 2011.

4.3. Características de los vectores para terapia génica

Para que una estrategia de terapia génica tenga éxito, es fundamental elegir el vector adecuado para cada situación, aunque hay unas características básicas y comunes que un vector “ideal” debe poseer (Tabla 8).

Tabla 8. Clasificación y características de los vectores virales más utilizados en terapia génica.

Virus	Familia	Material genético	Capacidad de empaquetamiento	Tropismo	Potencial inflamatorio	Forma del genoma viral en la célula	Principales limitaciones	Principales ventajas
CON ENVUELTA								
Retrovirus	Retroviridae	ssRNA	8 kb	Células en división	Bajo	Integrado	Solo transduce células en división. La integración puede inducir oncogénesis	Transferencia génica persistente en células en división
Lentivirus	Retroviridae	ssRNA	8 kb	Amplio	Bajo	Integrado	La integración puede inducir oncogénesis	Transferencia génica persistente en múltiples tejidos
HSV-1	Herpesviridae	dsDNA	40 kb* ‡ 150 Kb	Fuerte por neuronas	Alto	Episomal	Inflamatorio. Expresión del transgén transitoria en células no neuronales	Capacidad de empaquetamiento grande. Fuerte tropismo por neuronas
SIN ENVUELTA								
AAV	Parvoviridae	ssDNA	<5 kb	Amplio	Bajo	Episomal (>90%) Integrado (<10%)	Capacidad de empaquetamiento baja	No inflamatorios. No patogénicos
Adenovirus	Adenoviridae	dsDNA	8 kb* § 30 Kb	Amplio	Alto	Episomal	Potente respuesta inflamatoria inducida por la cápside	Transducción de múltiples tejidos extremadamente eficiente

*Defectivo en replicación. ‡Amplicón. §Helper dependent. HSV-1: Herpes Simple Virus-1. Adaptado de: Thomas et al.,. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. Nature Reviews. Genetics. 2003.

En primer lugar, debe tener un tropismo lo más específico posible con el fin de aumentar la transducción del tejido diana y a la vez minimizar la transducción en regiones no deseadas.

En segundo lugar, debe expresar el transgén durante un largo periodo temporal y alcanzar niveles de expresión terapéuticos. Una expresión baja del transgén podría no producir efecto. Hay que tener en cuenta, además, que una expresión demasiado alta podría resultar inmunogénica y producir un efecto citotóxico.

En tercer lugar, debería tener pocos efectos secundarios provocados por la administración del vector generando una mínima respuesta inmune contra el propio virus. Además, no debe causar patología infectiva.

Por último, es importante que el método de producción del vector viral sea escalable, es decir, que sea posible producir cantidades suficientes del vector y de alta pureza para su uso futuro en pacientes.

4.4. Vectores adenoasociados

De entre los diferentes vectores de terapia génica que se utilizan en ensayos clínicos en SNC en la actualidad, los virus adenoasociados (AAVs) son los que presentan un mayor potencial. Los AAVs, pertenecen a la familia *Parvoviridae*, donde se encuentran los virus de DNA más pequeños que infectan animales. Con un diámetro de aproximadamente 25nm, están compuestos por una cápside proteica que envuelve el genoma viral formado por una cadena simple de DNA (Cassinotti et al., 1988; McPherson & Rose, 1983). Aunque es muy común en humanos encontrar infecciones latentes por AAVs, todavía no se ha asociado ninguna patología a estos virus (Zaiss et al., 2002) por lo que están clasificados como nivel 1 de bioseguridad.

Pertenecientes al género *Dependovirus*, estos virus no son autónomos, sino que requieren de una co-infección con un virus *helper* para replicarse (Atchinson et al.,

1965). Aunque en un principio se pensó que los AAVs eran exclusivamente dependientes de adenovirus (de ahí su nombre), con el tiempo se observó que otros virus tales como *herpes simplex virus* (Georg-Fries et al., 1984), *vaccinia virus* (Schlehofer et al., 1986) o *human papillomavirus* (Ogston et al., 2000; Walz et al., 1997) podrían actuar como virus *helpers* permitiendo la replicación de los AAVs. Una vez infectan la célula diana, el genoma de los AAVs *wild-type* puede permanecer de forma episomal (Afione et al., 1996; Nakai et al., 2001) o bien integrarse en el genoma celular (Cheung et al., 1980; Kotin et al., 1990; Samulski et al., 1991) hasta que la célula es infectada por un virus capaz de actuar como *helper*. En ese momento, se reinicia el ciclo vital del AAVs completando su ciclo replicativo.

Se han aislado múltiples serotipos de AAVs tanto de cultivos como de muestras de humanos o de primates. Actualmente se han descrito 13 serotipos naturales distintos (AAV1-AAV13). Cada serotipo presenta un tropismo determinado que parece ser determinado por la unión a diferentes glúcidos presentes en las membranas que actuarían de receptores primarios. Se han identificado 23 receptores (Tabla 9).

El genoma de los AAVs *wild-type* consiste en una cadena de DNA simple (ssDNA) de aproximadamente 4.7kb, donde tanto la cadena *sense* como la *antisense* se empaquetan en viriones separados con una eficiencia equivalente (Berns & Adler, 1972). El genoma se organiza en dos genes que codifican para cuatro proteínas de replicación (Rep), tres proteínas de la cápside (Cap) y una proteína activadora de empaquetamiento, flanqueados por las secuencias ITR (*Inverted Terminal Repeat*). Estas regiones de 145pb contienen complementariedad interna generando una estructura secundaria en forma de T que protege los extremos de la degradación y actúan como origen de replicación genómica (Lusby et al., 1980; Srivastava et al., 1983).

Tabla 9. Receptores y co-receptores de los diferentes serotipos de vectores adenoasociados.

Serotipo AAV	Receptor primario	Co-receptor	Referencia
AAV1	α 2-3 and α 2-6 N-linked sialic acid (SIA)		Wu et al., 2006
AAV2	Heparan sulfate proteoglican (HSPG)	Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR1) α V β 5 and α 5 β 1 Integrins Hepatocyte Growth Factor Receptor (HGFR) Laminin Receptor (LamR)	Akache et al., 2006; Asokan et al., 2006; Kashiwakura et al., 2005; Qing et al., 1999; Summerford et al., 1999; Summerford & Samulski, 1998
AAV3	Heparan sulfate proteoglican (HSPG)	Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR1) Hepatocyte Growth Factor Receptor (HGFR) Laminin Receptor (LamR)	Akache et al., 2006; Blackburn et al., 2006; Handa et al., 2000; Ling et al., 2010
AAV4	α 2-3 O-linked sialic acid (SIA)		Walters et al., 2002
AAV5	α 2-3 N-linked sialic acid (SIA)	Platelet-derived Growth Factor Receptor (PDGFR)	Di Pasquale et al., 2003; Walters et al., 2001
AAV6	Heparan sulfate proteoglican (HSPG) α 2-3 and α 2-6 N-linked sialic acid (SIA)	Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)	Seiler et al., 2006; Weller et al., 2010; Wu et al., 2006
AAV7	Desconocido		
AAV8	desconocido	Laminin Receptor (LamR)	Akache et al., 2006
AAV9	Terminal N-linked galactose (GAL)	Putative integrin Laminin Receptor (LamR)	Akache et al., 2006; Shen et al., 2015; Shen et al., 2011
AAVrh10	Desconocido		
AAV11	Desconocido		
AAV12	Desconocido		
AAV13	Heparan sulfate proteoglican (HSPG)		Schmidt et al., 2008

Las proteínas Rep son las responsables de la replicación del genoma y su empaquetamiento en los viriones. Existen cuatro proteínas Rep denominadas por su peso molecular. Las proteínas Rep78 y Rep68 intervienen en la replicación y la transcripción del genoma. Además, son las responsables de la integración del genoma viral en la célula huésped. Por otro lado, las proteínas Rep más pequeñas,

Rep40 y Rep52, son las responsables del empaquetamiento del DNA dentro de la cápside (Im & Muzyczka, 1990, 1992). El gen Cap codifica para las proteínas que forman la cápside del virión. El *Open Reading Frame 1* (ORF1) genera tres proteínas, VP1, VP2 y VP3 que aparecen en el virión en una proporción de 1:1:10 (VP1:VP2:VP3) para formar cada una de las subunidades de la cápside icosaédrica con la ayuda de la proteína AAP (*Assembly-Activating Protein*) expresada en el ORF2 del mismo gen (Naumer et al., 2012).

4.4.1. Características de los AAVs como vectores de terapia génica

Como vectores para terapia génica, los AAVs presentan grandes ventajas respecto otros sistemas de transducción. Inicialmente, eran producidos mediante coinfección de las células productoras con virus adenovirales que actuaban de *helpers*. Mediante este método se obtenían títulos elevados. No obstante, se generaban gran cantidad de adenovirus que contaminaban las producciones. Éstos, producían una gran respuesta inmune que acababa eliminando la expresión de los transgenes. Para evitar esta problemática, se implantó el método de la triple transfección para la producción de vectores AAVs en el laboratorio (Xiao, Li, & Samulski, 1998) (Figura 14).

Este método se beneficia del hecho de que el único elemento necesario en *cis* para la replicación y el empaquetamiento del DNA del AAVs son las secuencias ITR. En primer lugar, se genera un plásmido vector de DNA donde se eliminan los genes Rep y Cap (todo el genoma del AAV a excepción de las secuencias ITR de los extremos) y en su lugar se incorpora el *cassette* de expresión con el gen terapéutico o gen de interés con un promotor y una región de poliA. Por otro lado, los genes Rep y Cap específicos de un serotipo determinado se expresan en *trans* a partir de un plásmido diferente que no contiene ITR (plásmido AAV *helper*). De este modo, no se generan vectores AAVs *wild-type*. Finalmente, el adenovirus que actuaría de *helper* se sustituye por un plásmido que contiene los genes adenovirales E1a, E1b, E4orf6 y VA necesarios para la replicación del vector AAV.

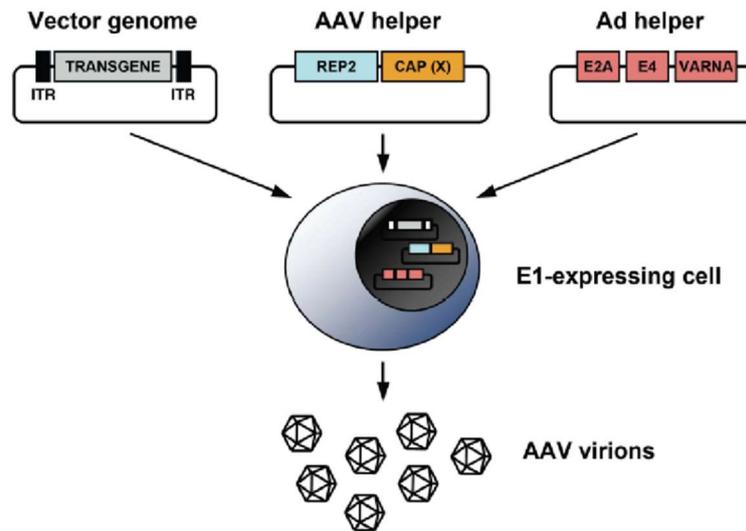


Figura 14. Método de la triple transfección para la producción de vectores AAV. Fuente: Ayuso et al., Production, purification and characterization of adeno-associated vectors. Current Gene Therapy. 2010.

Gracias al método de la triple transfección se obtienen producciones donde los vectores resultantes no expresan ningún gen viral ni contienen virus *helpers* contaminantes. Así, los vectores únicamente expresan el gen de interés y no se genera una respuesta citotóxica que elimina las células infectadas como ocurre con vectores que expresan genes propios, lo que permite la expresión del transgén durante largos periodos.

Otra gran ventaja de los vectores AAVs para su utilización en terapia génica es su baja inmunogenicidad. Cuando se administra un vector viral en un organismo se expresan citoquinas destinadas a evitar que el virus se propague. Tras una administración intravenosa de un vector AAV, se ha observado un aumento de citoquinas y quimiocinas propias de la respuesta innata como por ejemplo TNF α , RANTES, IP-10, MIP-1 β , MCP-1 y MIP-2. No obstante, los niveles son 40 veces menores que en el caso de una administración de un vector adenoviral. Además, la activación de la respuesta también resulta más corta. Mientras que en el caso de vectores adenovirales se alarga durante 24 horas, el efecto dura únicamente seis horas tras la administración de vectores AAVs (Zaiss et al., 2002).

Asimismo, la existencia de hasta 13 serotipos confiere a los AAVs una gran variedad de tropismos y aplicaciones en el campo de la terapia génica. Además, los diferentes serotipos son capaces de transducir diferentes tejidos en función de la vía de administración de manera que permiten un amplio abanico de posibilidades en el campo de la terapia génica. Finalmente, gracias al método de la triple transfección también se ha desarrollado el fenómeno del *cross-packaging*. El *cross-packaging* permite que un vector derivado del genoma del AAV2, el cual es el serotipo más estudiado y caracterizado, pueda encapsidarse con cápsides de otros serotipos formando los denominados pseudotipos de AAVs. Para ello se mantienen las ITR del serotipo 2 en el genoma y en el plásmido que contiene los genes Rep y Cap del AAV2 y se cambian los genes Cap por los de serotipo deseado (Rabinowitz et al., 2002).

A pesar de la gran cantidad de ventajas que presentan, también existen algunas desventajas. La más destacable es su limitada capacidad de clonación. Los AAVs tienen un genoma de aproximadamente 4.7kb de manera que únicamente se pueden incorporar fragmentos de longitud similar. Se ha podido comprobar que cuando se sobrepasa el límite, los vectores no se encapsidan correctamente (Dong et al., 1996). Cabe destacar, que el *cassette* de expresión que se incorpora en un sistema de terapia génica debe contener un promotor y una región de poliA para su expresión dejando así una capacidad de clonación reducida no apta para muchos genes terapéuticos.

Además, los vectores AAVs poseen un genoma en forma de ssDNA que debe ser convertido a dsDNA para que se inicie la expresión del transgén de manera que resultan vectores particularmente lentos (Coura & Nardi, 2007).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Con el envejecimiento de la sociedad, las enfermedades autoinmunes han aumentado exponencialmente su prevalencia durante el último siglo. Éstas, suponen un gran coste socioeconómico debido a que la mayoría suelen cronificarse durante toda la vida de los pacientes acarreando grandes costos en tratamientos y dependencia.

La EM es la enfermedad más representativa del grupo de enfermedades desmielinizantes del SNC. Su prevalencia en España ha aumentado desde 5-23 casos/100000 habitantes antes de 1990 hasta la 80-100/100000 en la actualidad. Actualmente se trata de una enfermedad sin cura, donde los tratamientos están destinados a paliar la sintomatología y a frenar, parcialmente, el avance de la enfermedad. No obstante, ningún tratamiento está resultando efectivo en evitar la progresión de la enfermedad y, por ello, resulta necesaria la investigación de nuevas terapias.

En los últimos años ha aparecido un interés creciente en la inmunomodulación de la vía de Th17 como estrategia terapéutica, ya sea para la EM como para otras enfermedades autoinmunes. Y, en ese sentido, se han desarrollado múltiples terapias innovadoras destinadas a ese propósito identificando una gran cantidad de posibles dianas terapéuticas. Debido a la clara implicación de las interleuquinas IL-23 e IL-7 en la etiopatogenia de la EM, se decidió estudiar una actuación sobre sus vías de transducción como medida terapéutica.

Nuestra hipótesis es que la utilización de receptores solubles como elementos de captura de interleuquinas suponen una alternativa viable a la utilización de anticuerpos y, además, a largo plazo, conllevan una ventaja terapéutica al reducir posibles efectos indeseados.

En este trabajo, nos propusimos la utilización de una estrategia de terapia génica utilizando receptores solubles para la IL-23 y la IL-7 con el objetivo de actuar como inhibidores de sus funciones sobre sus respectivos receptores transmembrana. Para ello, planteamos los siguientes objetivos concretos:

1. Diseño y generación de vectores virales de terapia génica portadores de genes potencialmente terapéuticos.

- Diseño del gen de fusión sIL-23R-sIL-7R utilizando una secuencia de unión flexible.
- Producción de vectores Ad5 portadores de sIL-23R, sIL-7R y sus correspondientes formas transmembranales (IL-23R y IL-7R), así como de la proteína de fusión sIL-23R-sIL-7R.
- Producción de vectores AAV8 y AAV9 portadores de los diferentes genes (sIL-23R, sIL-7R y sIL-23R-sIL-7R).

2. Caracterización de los diferentes vectores AAVs y Ad5 portadores de las formas transmembranales y solubles de IL-23R e IL-7R.

- Caracterización de la infectividad de los diferentes vectores *in vitro*.
- Demostración de la expresión de los diferentes genes *in vitro*.
- Demostración de la expresión de los diferentes genes *in vivo*.

3. Caracterización *in vitro* del bloqueo de las interacciones IL-23:IL-23R e IL-7:IL-7R.

- Demostración de la interacción entre sIL-23R e IL-23 *in vitro*.
- Demostración de la interacción entre sIL-7R e IL-7 *in vitro*.
- Demostración del bloqueo de la señalización de las interleuquinas mediante los receptores solubles *in vitro*.

4. Estudio *in vivo* del potencial terapéutico de sIL-23R, sIL-7R y sIL-23R-sIL-7R a nivel clínico e histopatológico en un modelo murino de EAE.

RESULTADOS

En trabajos previos, nuestro grupo había demostrado que el sIL-23R podría tener un efecto beneficioso en el tratamiento de la EAE (Miralles et al., 2017). Muchos receptores de citoquinas presentan de forma natural alguna o varias isoformas solubles. Se ha hipotetizado mucho sobre las funciones de estas formas solubles de receptores transmembrana y, a pesar de no estar claro, parece ser que podrían actuar bien como agonistas, bien como antagonistas de las funciones de la citoquina en cuestión. Estas isoformas pueden generarse ya sea por *splicing* alternativo o por liberación de la región extracelular del receptor transmembrana mediante proteasas. En el caso del IL-23R, se demostró que en humanos existía una isoforma que, mediante *splicing*, generaba una proteína carente de la región transmembrana capaz de liberarse por exocitosis al exterior (Zhang et al., 2006). Del mismo modo, también se conoce una isoforma soluble para el IL-7R tanto en humanos como en ratones (Goodwin et al., 1990).

1. CLONACIÓN DEL GEN TERAPÉUTICO sIL-7R EN VECTORES PARA TERAPIA GÉNICA

Debido a la clara implicación de la vía de IL-7 en la EM y en otras enfermedades autoinmunes se pensó en la utilización del sIL-7R como un posible candidato para ser utilizado de manera terapéutica. En primer lugar, se solicitó a la empresa Eurofins genomics® la síntesis del gen sIL-7R. Posteriormente, dicha secuencia se clonó en vectores virales (adenovirus y AAVs) de forma similar a la clonación del gen del sIL-23R realizada en un estudio anterior (Miralles et al., 2017).

1.1. Clonación del gen sIL-7R en un vector adenoviral

Los genomas adenovirales constan de 36 Kb y, debido a su tamaño, no pueden generarse por ligación simple. Así pues, para su generación, es necesario generar

primero un plásmido intermedio o lanzadera con el transgén que contenga, además, regiones de homología con el plásmido final.

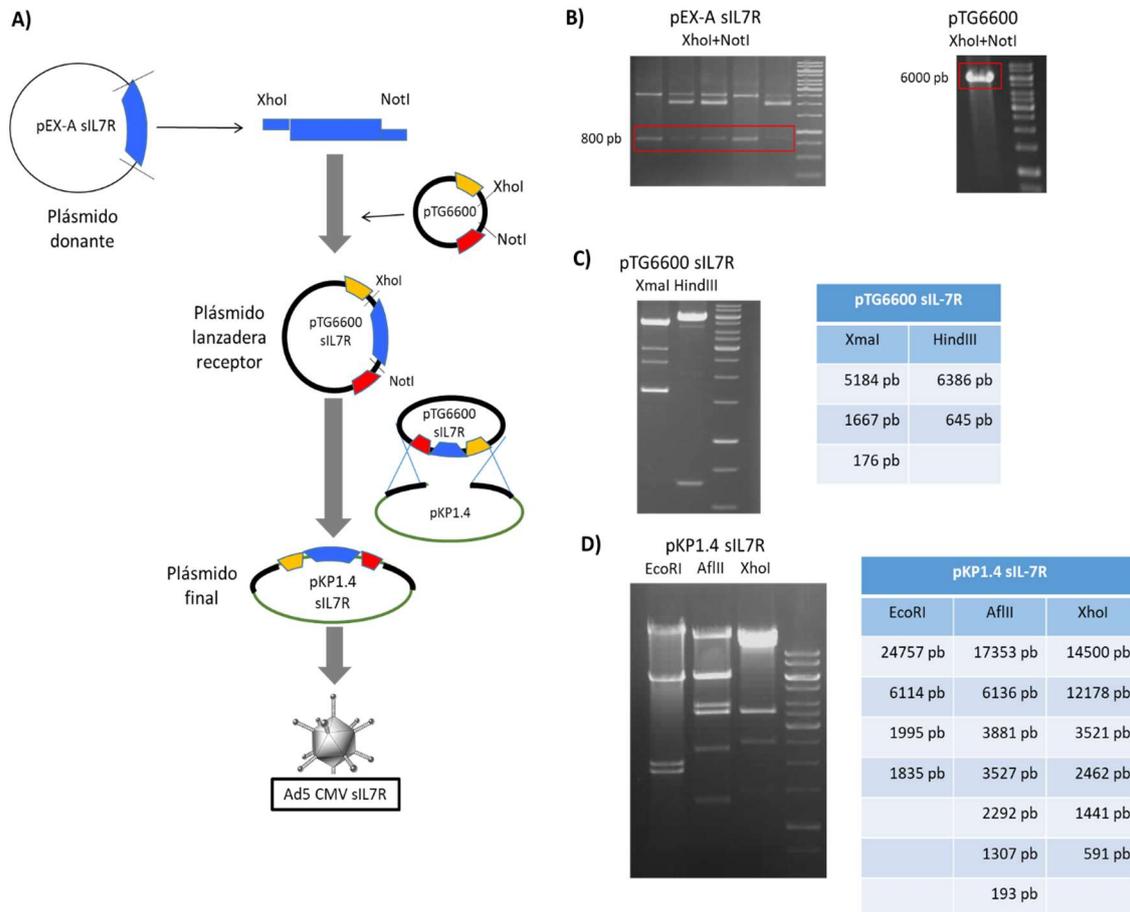


Figura 15. Generación del plásmido pKP1.4 sIL-7R para la producción de un vector adenoviral portador del transgén sIL-7R. **(A)** Esquema de la estrategia de clonaje del gen sIL-7R en un vector adenoviral donde el *Open Reading Frame* del gen sIL-7R (azul) generado por síntesis procedente de un plásmido donante (pEX-A sIL-7R) se introduce mediante digestión y ligación en el plásmido lanzadera (pTG6600). A partir del plásmido pTG6600 sIL-7R, se genera el genoma de un vector adenoviral de serotipo 5 mediante recombinación homóloga con el plásmido pKP1.4. En amarillo se representa la secuencia del promotor CMV y en rojo la secuencia de poliadenilación. **(B)** Geles de agarosa 1% para separar y purificar los fragmentos para ligar y generar el plásmido lanzadera pTG6600 sIL-7R. **(C)** Comprobación del plásmido pTG6600 sIL-7R mediante enzimas de restricción y el patrón de bandas esperado. **(D)** Comprobación mediante enzimas de restricción del plásmido final pKP1.4 sIL-7R para la generación del HAd5 sIL-7R y el patrón de bandas esperado.

En la figura 15 se muestran las diferentes etapas para la generación de un vector adenoviral HAd5 CMV sIL-7R. En primer lugar, el gen sintético se extrajo del plásmido comercial (pEX-A sIL-7R) mediante las enzimas de restricción XhoI y NotI y fue posteriormente purificado mediante un gel de agarosa del 1% (Figura 15 B). Paralelamente, el vector receptor, se abrió mediante las mismas enzimas de restricción, se purificó mediante el mismo método y se desfosforiló mediante fosfatasa alcalina para evitar la religación y reducir el número de colonias negativas. Finalmente, ambos fragmentos se ligaron mediante T4 ligasa para generar el plásmido lanzadera intermedio pTG6600 sIL-7 (Figura 15 C).

Una vez obtenido el plásmido lanzadera, se abrió el genoma del adenovirus (pKP1.4) y se separó mediante enzimas de restricción la región correspondiente al transgén conjuntamente con las regiones de homología con el genoma del adenovirus del plásmido pTG6600 sIL-7R. Ambas secuencias se introdujeron en bacterias recombinasa positivas con el objetivo de generar el plásmido final por recombinación homóloga (Figura 15 D). El resultado final fue la generación de un plásmido que, al transfectarse en células eucariotas, fuese capaz de generar vectores adenovirales del serotipo 5 portadores del transgén sIL-7R bajo el control del promotor CMV.

1.2. Clonación del gen sIL-7R en un vector adenoasociado

Con el objetivo de generar también AAVs portadores del transgén sIL-7R se procedió a clonar el gen en un plásmido portador de las secuencias flanqueantes ITR. Este plásmido es capaz de generar vectores AAVs cuando se co-transfecta junto a un plásmido *helper* portador de los genes adenovirales esenciales para la producción, más un segundo plásmido portador de los genes Rep y Cap del AAV.

Para generar el plásmido capaz de producir vectores AAVs se partió del mismo plásmido sintético que para la generación del vector adenoviral (Figura 16). Una vez extraído mediante enzimas de restricción (XbaI y NotI), el transgén se ligó en el plásmido final (Figura 16 B). Finalmente, se comprobó primero mediante

enzimas de restricción y posteriormente mediante secuenciación, que el plásmido poseía todos los elementos necesarios para la generación de AAVs (promotor, señal de poliadenilación y secuencias ITR) (Figura 16 C).

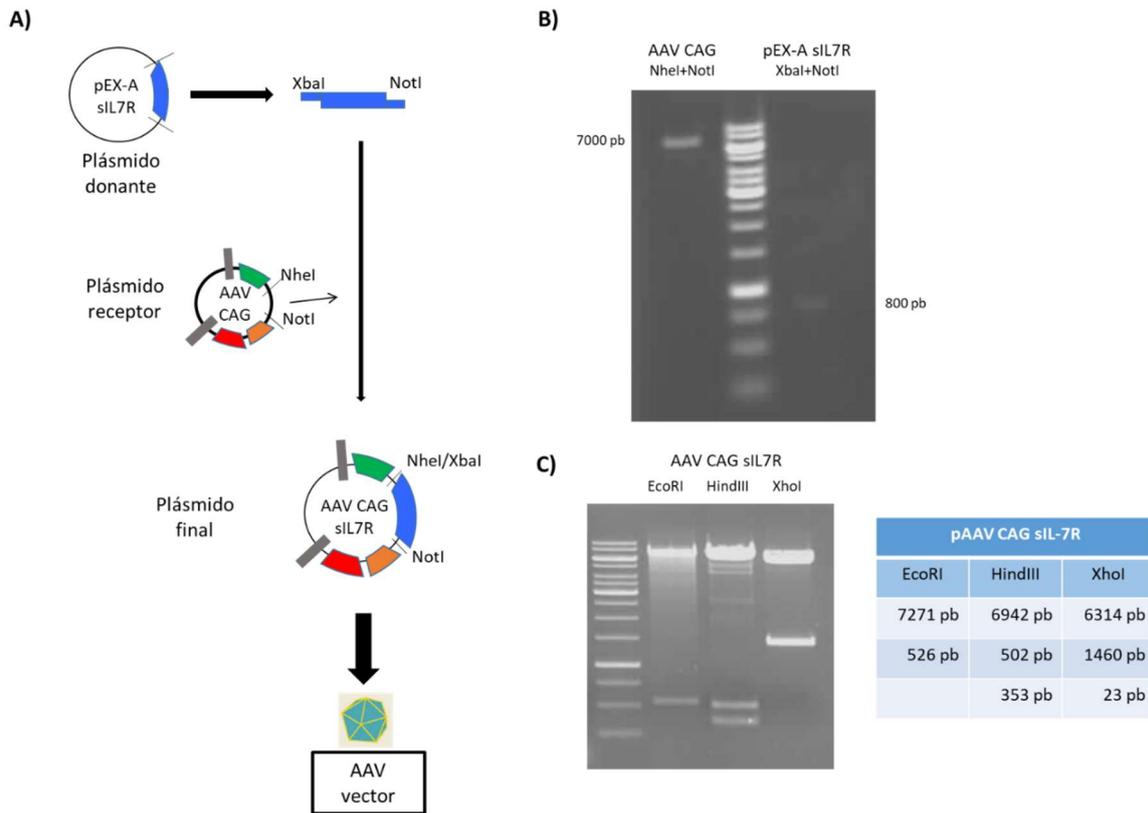


Figura 16. Generación del plásmido pAAV CAG sIL-7R para la producción de un vector adenoasociado portador del transgén sIL-7R. **(A)** Esquema de la estrategia de clonaje del gen sIL-7R en un vector adenoasociado. El *Open Reading Frame* generado por síntesis correspondiente al sIL-7R (azul) procede del plásmido comercial (pEX-A sIL-7R). Mediante digestión y ligación se introduce en el plásmido final (AAV CAG) generando el vector definitivo (AAV CAG sIL-7R) que a través del método de la triple transfección generará el vector AAV portador del transgén. En verde se representa la secuencia del promotor CAG, en naranja la secuencia WPRE, en rojo la secuencia de poliadenilación y en gris las secuencias ITR. **(B)** Gel de agarosa 1% para la purificación de los componentes (vector e inserto) de la ligación. **(C)** Comprobación mediante enzimas de restricción del plásmido pAAV CAG sIL-7R para la generación de vectores AAVs y el patrón de bandas esperado.

2. GENERACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN sIL-23R-sIL-7R COMO MOLÉCULA TERAPÉUTICA PARA LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Debido a que en este trabajo se iba a utilizar tanto sIL-23R como sIL-7R y que, en ambos casos, podrían presentar un posible efecto beneficioso sobre la EAE, se decidió generar una terapia combinada que fuese capaz de actuar sobre las dos citoquinas al mismo tiempo. Así, se decidió generar una nueva molécula compuesta por ambos receptores solubles unidos por una secuencia de unión capaz de permitir la suficiente flexibilidad como para que los dos receptores fueran funcionales (Klein et al., 2014).

Para la generación del ORF (Figura 17) se buscó la última diana de restricción presente en la secuencia del gen sIL-23R (BspEI) y la primera diana presente en sIL-7R (XhoI) y se sintetizó un oligonucleótido con el final de la secuencia del gen sIL-23R (desde la diana BspEI hasta el codón stop seguido de la secuencia Gly₄Ser correspondiente al *Flexible Linker*). En esta secuencia, el codón stop TGA del gen sIL-23R se eliminó para no interrumpir el marco de lectura. Finalmente, se introdujo una diana XhoI antes de la diana XmaI para introducir el gen sIL-7R.

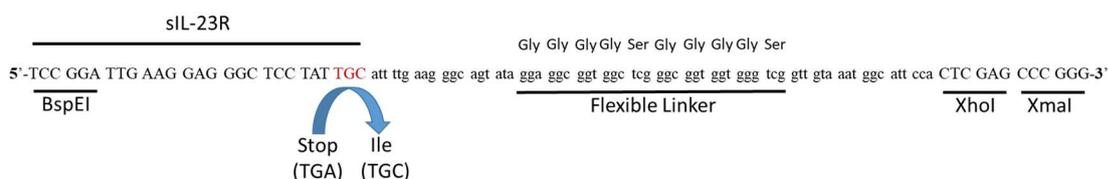


Figura 17. Diseño de la secuencia nucleotídica del *Flexible Linker* formado por la secuencia Gly₄Ser flanqueada por las enzimas de restricción necesarias para su clonación. Se sustituye, además, el codón *stop* del ORF del sIL-23R por una isoleucina.

En los extremos de la secuencia de los oligonucleótidos que formarían el *linker* se introdujeron las dianas BspEI y XmaI (compatible con los extremos BspEI) y se hibridaron las dos cadenas *in vitro* para obtener un fragmento de DNA de doble

cadena. Posteriormente, se abrió el plásmido pTG6600 sIL-23R mediante la enzima BspEI para introducir el *linker* y generar el ORF sIL-23R-*Flexible Linker*. Esta secuencia tenía el *linker* al final del gen sIL-23R sin secuencia *stop* y, tras el *linker*, la secuencia original del final del gen sIL-23R con su TGA de *stop* correspondiente. Además, la introducción de la diana XmaI en el *linker* (que al realizar el clonaje eliminaría la diana BspEI) favorecía la identificación de aquellas colonias que tenían la secuencia incorporada en la orientación adecuada (Figura 18).

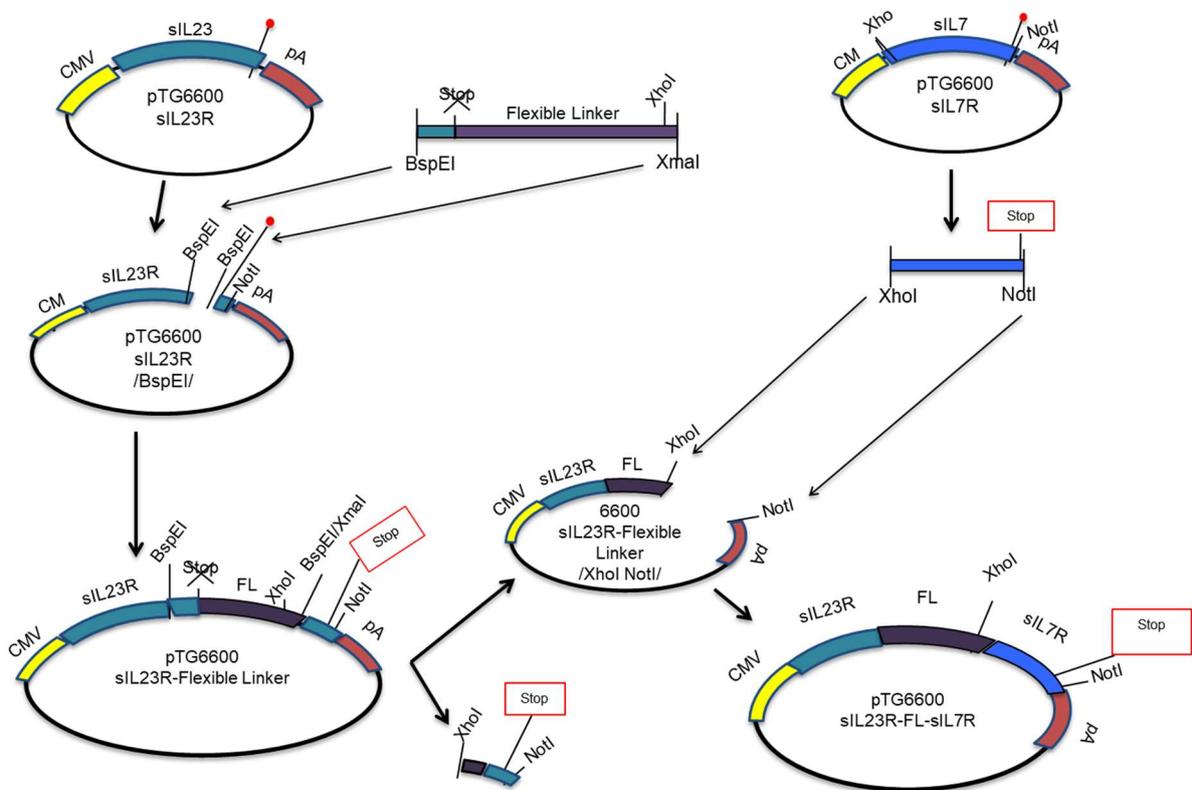


Figura 18. Esquema de la estrategia de clonaje de la proteína de fusión sIL-23R-sIL-7R. La secuencia correspondiente al *Flexible Linker* procedente de la hibridación de dos oligonucleótidos fosforilados en 5' se introduce en el plásmido portador de la proteína sIL-23R. Posteriormente, se extrae la secuencia de la proteína sIL-7R del plásmido pTG6600 sIL-7R introduciéndola tras la secuencia del *Flexible Linker* manteniendo el marco de lectura y la secuencia *stop* de sIL-7R. Las secuencias correspondientes a los ORFs de sIL-23R y sIL-7R se muestran en verde y azul respectivamente. En amarillo se representa la secuencia del promotor CMV, en morado la secuencia correspondiente al *Flexible Linker* y en rojo la secuencia de poliadenilación.

Una vez comprobada la secuencia positiva y amplificada, se digirió con XhoI y NotI para eliminar el fragmento sIL-23R-stop original y sustituirlo por la secuencia del gen sIL-7R. En la figura 19 se muestra la comprobación mediante enzimas de restricción de la construcción final de la proteína de fusión sIL-23R-sIL-7R en el plásmido pTG6600.

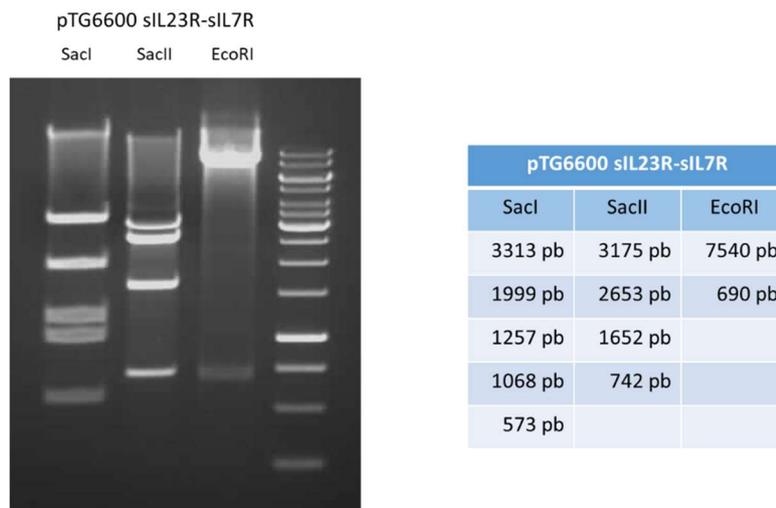


Figura 19. Comprobación mediante enzimas de restricción del plásmido pTG6600 sIL-23R-sIL-7R para la generación de vectores adenovirales y el patrón de bandas esperado.

A partir del plásmido pTG6600 sIL-23R-sIL-7R, se generó mediante recombinación homóloga el genoma del adenovirus 5 (plásmido pKP1.4 sIL-23R-sIL-7R), mientras que los genomas AAVs (plásmidos pAAV CAG sIL-23R-sIL-7R y pGV CMV sIL-23R-sIL-7R) se generaron mediante clonación por ligación de forma similar a la realizada con el sIL-7R. En ambos casos, el transgén se extrajo del plásmido pTG6600 sIL-23R-sIL-7R digerido con las enzimas de restricción NheI y NotI y se introdujo en los plásmidos pAAV CAG y pGV CMV abiertos con AvrII+NotI y con NheI+NotI, respectivamente.

3. PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VECTORES TERAPÉUTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

3.1. Vectores adenovirales Ad5

3.1.1. Producción de vectores adenovirales

Una vez obtenidos los genomas de los adenovirus portadores de los transgenes correspondientes al sIL-7R y a la proteína de fusión sIL-23R-sIL-7R, se procedió a su producción siguiendo el protocolo detallado en la figura 20 (Miralles et al., 2014).

En primer lugar, tal y como se esquematiza en la figura 20 se linealizaron los genomas de los adenovirus mediante la enzima de restricción PacI y, posteriormente, se transfectó en células HEK-293 para la generación de un pre-stock viral. Esta línea celular contiene la secuencia E1 del adenovirus de manera que permite su replicación. Una vez obtenido el pre-stock, se realizó la producción final y se purificó mediante un doble gradiente de CsCl seguido de una cromatografía de exclusión molecular. Finalmente se obtuvo el título final de la producción (Tabla 10).

3.1.2. Caracterización de los vectores adenovirales

Una vez producidos los vectores se procedió a su caracterización en células. El primer paso fue averiguar si dichos vectores eran capaces de entrar en células mediante la detección del genoma en su interior. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos específicos para los genes sIL-7R e IL-7R y se infectaron células A549 a una multiplicidad de infección (MOI) de 5. La línea celular A549 no es permisiva para la replicación de los adenovirus. Por tanto, el hecho de utilizar una línea celular no replicativa y una dosis de infección baja (MOI 5), permite la detección de expresión en condiciones más parecidas a las que posteriormente se

observarán *in vivo*. Finalmente, a las 72 horas postinfección se extrajo el DNA genómico mediante el método de *Hirt* y se analizó por PCR.

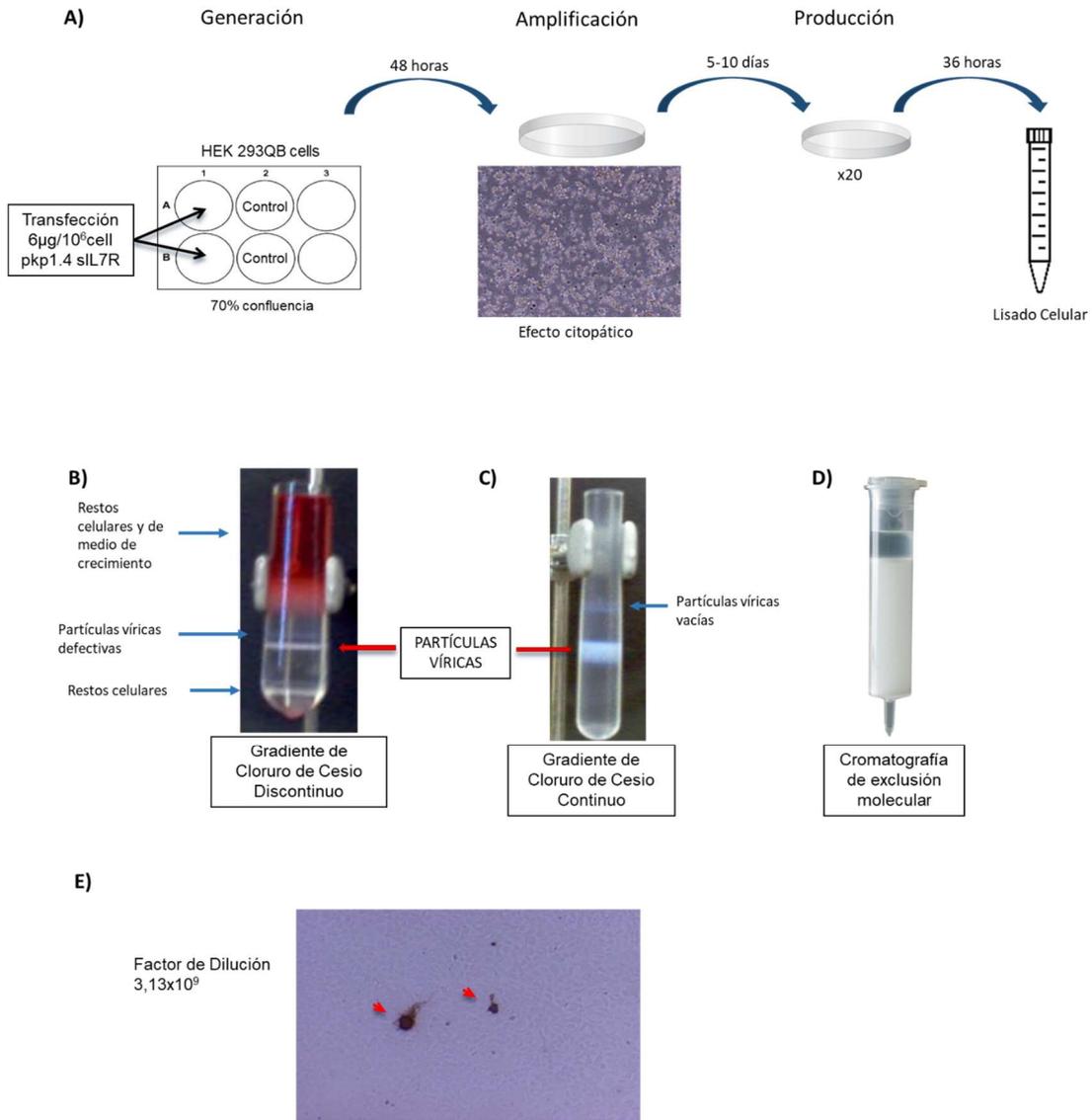


Figura 20. Generación de vectores adenovirales. **A)** Esquema del protocolo de producción del vector adenoviral portador del transgén sIL-7R donde se detallan los procesos de generación del vector (transfección en placa de 6 pocillos y recogida a las 48 horas), la etapa de amplificación (infección con el lisado crudo procedente de la transfección de una placa de 10 cm y recogida entre 5-10 días post-infección cuando aparece efecto citopático) y la etapa de producción (infección de 20 placas de 15 cm y recogida 36 horas post-infección). **B)** Gradiante discontinuo de CsCl. **C)** Gradiante continuo de CsCl. **D)** Cromatografía de exclusión molecular. **E)** Tinción anti-hexon para titulación de infectividad en células HEK-293.

Tabla 10. Vectores adenovirales generados portadores de los diferentes transgenes.

	TÍTULO (IU/mL)	TÍTULO (PP/mL)	RATIO IU/PP
Ad5 CMV siL-7R	$5,52 \times 10^{10}$	$1,49 \times 10^{12}$	1/27
Ad5 CMV IL-7R	$9,60 \times 10^{10}$	$1,74 \times 10^{12}$	1/18
Ad5 CMV siL-23R-siL-7R	$2,76 \times 10^{10}$	$3,43 \times 10^{12}$	1/124

Tal y como se puede observar en la figura 21, cada pareja de *primers* utilizada es gen específica. Además, se demuestra que los vectores generados son capaces de entrar en las células utilizadas y liberar el transgén en su interior.

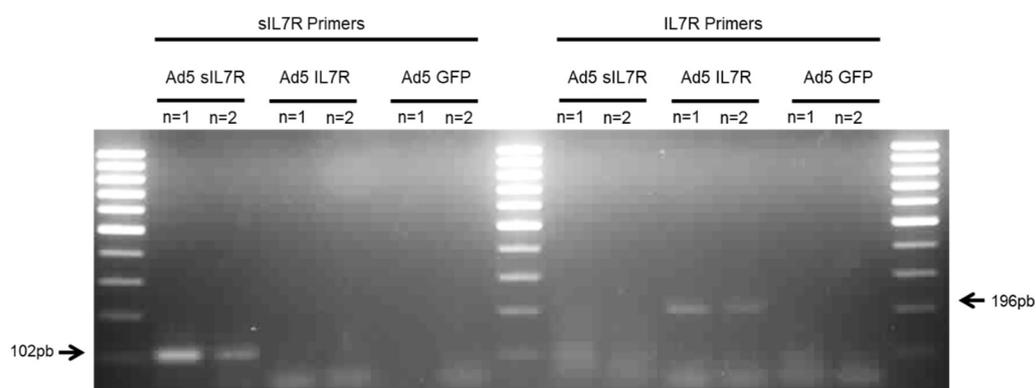


Figura 21. PCR con *primers* específicos para siL-7R e IL-7R de extracciones de DNA genómico de células A549 no permisivas para la replicación de vectores adenovirales infectadas con Ad5 siL-7R, Ad5 IL-7R y Ad5 GFP a MOI 5 durante 72 horas.

Posteriormente, se procedió a comprobar la expresión de los diferentes transgenes. Tal y como se muestra en la figura 22, tanto el vector Ad5 siL-7R (A) como el Ad5 IL-7R (B) son capaces de expresar el mRNA correspondiente al

transgén ya que se observa amplificación por PCR únicamente en aquellas muestras retrotranscritas.

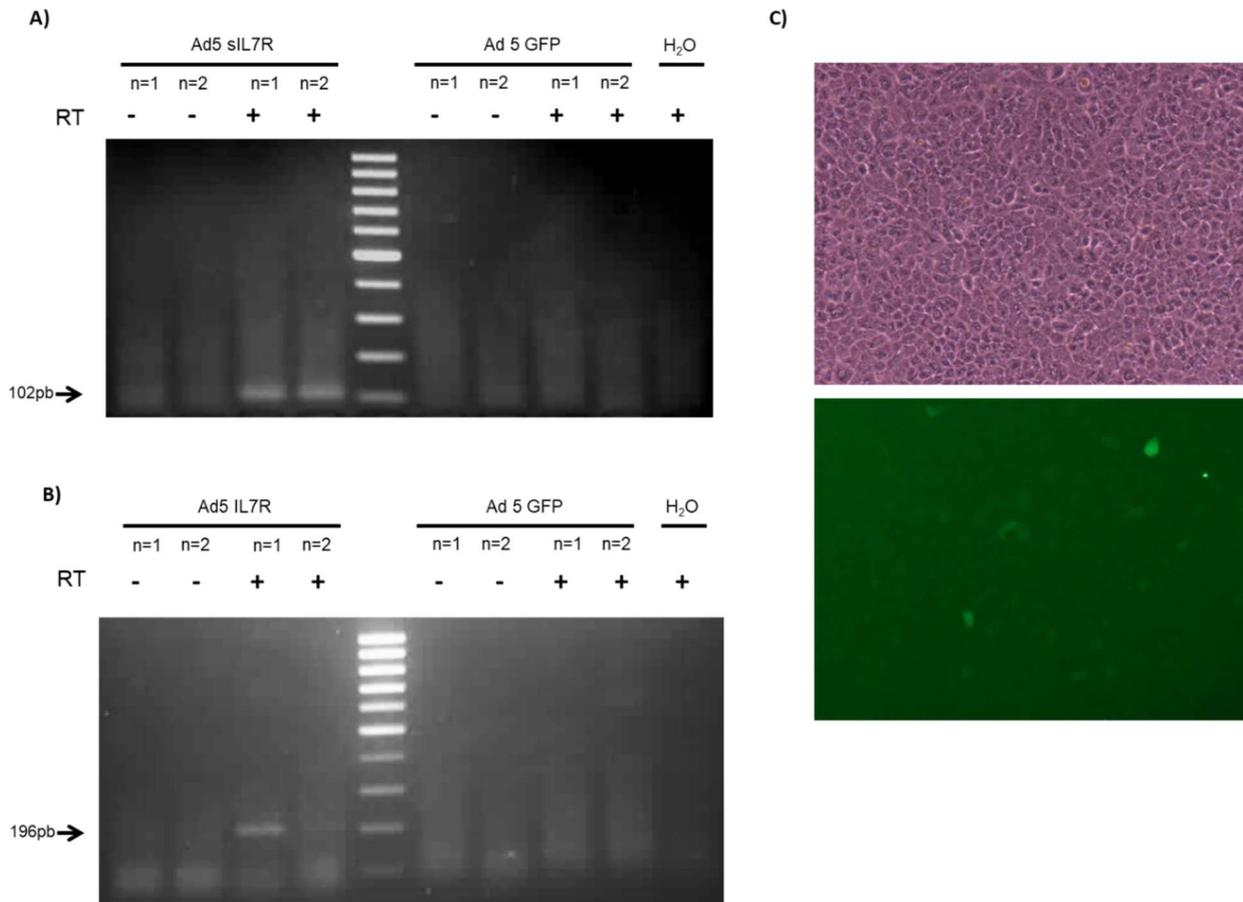


Figura 22. PCR con *primers* específicos para los transgenes sIL-7R **(A)** e IL-7R **(B)** de extracciones de RNA retrotranscritas de células A549 infectadas con Ad5 sIL-7R, Ad5 IL-7R y Ad5 GFP a MOI 5 durante 72 horas. **C)** Micrografía de campo claro y con filtro de fluorescencia en el momento de la recogida correspondiente a la infección con Ad5 GFP.

Para la detección de manera específica del gen sIL-23R-sIL-7R se decidió utilizar parte de la secuencia de cada proteína y parte del *linker* como molde para los *primers* y así evitar la amplificación de los diferentes genes endógenos tal y como se esquematiza en la figura 23.



Figura 23. Esquema del diseño de los *primers* específicos para sIL-23R-sIL-7R.

En la figura 24 se muestra una PCR de puesta a punto donde se utilizan como controles plásmidos portadores de las dos proteínas por separado y de la proteína de fusión sIL-23R-sIL-7R. Se puede observar la amplificación de manera específica de la proteína de fusión, mientras que los genes por separado no presentan señal demostrando que los cebadores o *primers* son específicos para la detección del gen sIL-23R-sIL-7R de fusión.

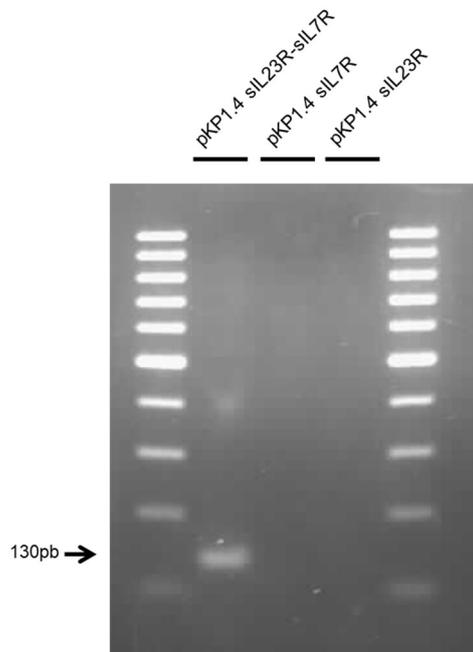


Figura 24. Especificidad de los *primers* para la detección de la proteína de fusión sIL-23R-sIL-7R. PCR de DNA plasmídico portador de los genes sIL-23R-sIL-7R, sIL-7R y sIL-23R con *primers* específicos para sIL-23R-sIL-7R.

En la figura 25, se muestra que el vector Ad5 sIL-23R-sIL-7R es capaz de expresar el gen. Igual que lo ocurrido con anterioridad, en las extracciones de RNA se obtiene una fracción de los genomas virales que, tras realizarse la amplificación por PCR, presenta señal (muestra sin DNAsa ni retrotranscripción). Este fenómeno desaparece al tratarse la muestra con DNAsa antes de la retrotranscripción de manera que la señal observada en el carril con DNAsa I y RT corresponde al mRNA real. La utilización de una línea celular no permisiva para la replicación, además, reduce la contaminación de genomas virales en la extracción inicial.

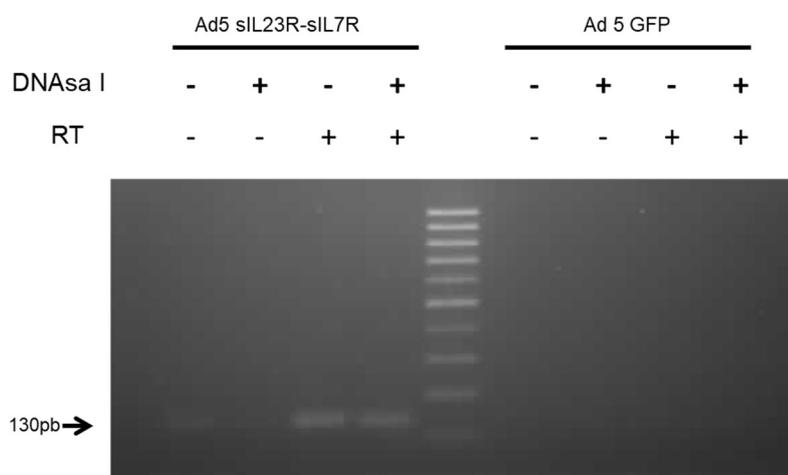


Figura 25. PCR con *primers* específicos para la proteína de fusión sIL-23R-sIL-7R de extracciones de RNA retrotranscritas de células A549 infectadas con Ad5 sIL-23R-sIL-7R y Ad5 GFP a MOI 5 durante 72 horas.

3.2. Vectores adenoasociados

3.2.1. Producción de vectores adenoasociados

La producción de los vectores AAVs se basa en la metodología de la triple transfección. Este método utiliza tres plásmidos que se introducen en cada célula para lograr la producción de las partículas virales. El primer plásmido contiene el genoma del vector. Éste contiene el *cassette* de expresión formado por un

promotor, el gen a expresar y una secuencia de poliadenilación flanqueados por las secuencias ITR que permitirán la encapsidación. El segundo plásmido es el plásmido *helper* adenoviral que contiene los genes de los adenovirus necesarios para la replicación del genoma (plásmido pXX6). Por último, el plásmido con los genes de la replicasa y de la cápside darán el serotipo al vector producido (plásmidos pRep2Cap8 y pRep2Cap9 para AAV8 y AAV9 respectivamente).

En la figura 26 se muestra como ejemplo la producción del vector AAV8 CMV sIL-7R. De manera habitual en nuestro laboratorio, las producciones de vectores se realizan transfectando 4×10^8 células HEK-293 en adherencia.

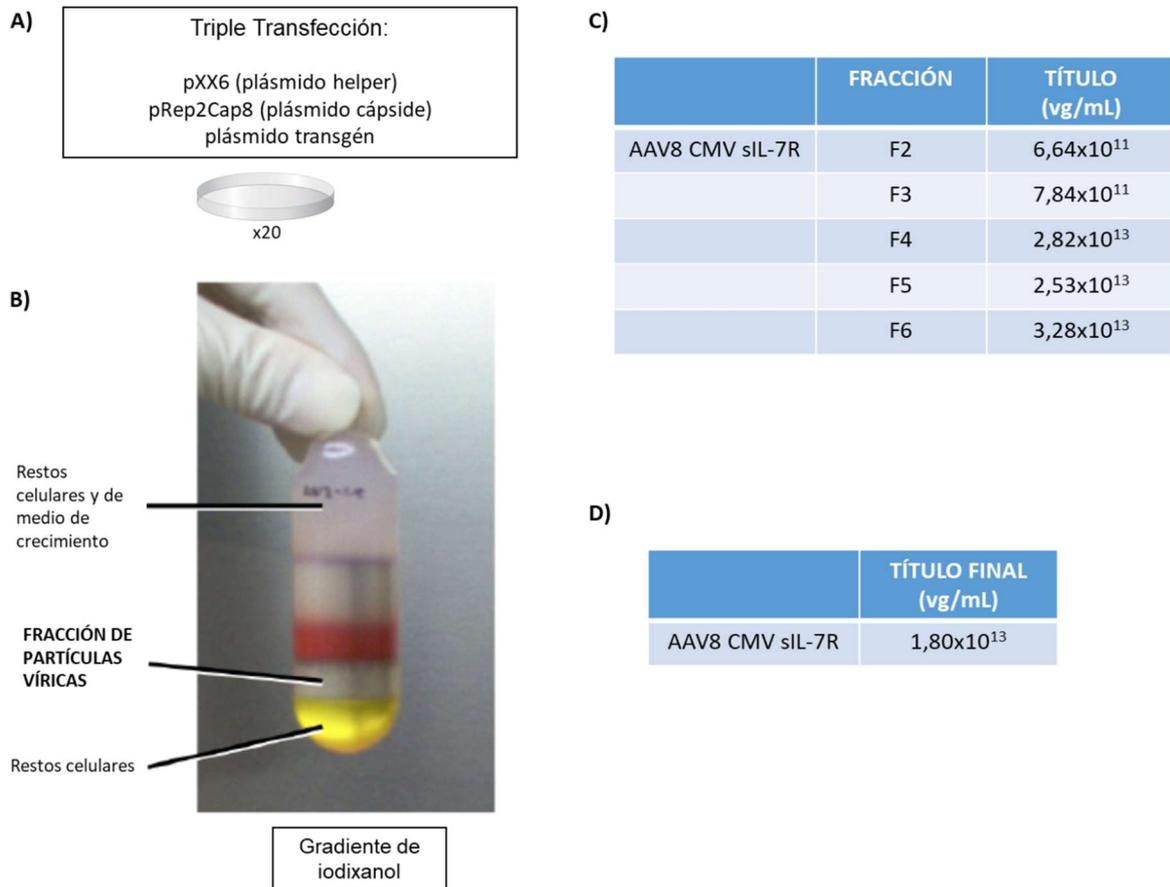


Figura 26. Esquema del protocolo de producción del vector AAV portador del transgén sIL-7R. **A)** Transfección en placa de 15 cm. **B)** Purificación del lisado celular mediante un gradiente de iodixanol. **C)** Titulación de las fracciones **D)** Titulación final de la producción.

Tras 48 horas, se recogen las células, se extraen los AAVs por lisis (congelación/descongelación) y se purifican por gradiente de iodixanol (Figura 26 B). Posteriormente, se titulan las fracciones obtenidas mediante el método de picogreen en vg/ml (*viral genomes/ml*) (Piedra et al., 2015) (Figura 26 C). Las fracciones con mayor concentración viral (F4, F5 y F6), se juntaron para obtener la producción viral final que, por último, fue retitulada por el método de picogreen (Figura 26 D). En la tabla 11, se muestran los diferentes vectores AAV8 generados para los distintos transgenes.

Tabla 11. Vectores AAV8 generados portadores de los diferentes transgenes.

VECTOR	TÍTULO (vg/ml)
AAV8 CMV sIL-7R	$1,80 \times 10^{13}$
AAV8 CAG sIL-7R	$7,25 \times 10^{12}$
AAV8 CMV sIL-23R	$8,40 \times 10^{12}$
AAV8 CAG sIL-23R-sIL-7R	$6,85 \times 10^{11}$
AAV8 CMV sIL-23R-sIL-7R	$1,93 \times 10^{13}$

En todos los casos, se observa una productividad similar excepto para el vector AAV8 CAG sIL-23R-sIL-7R. Cabe destacar que el plásmido correspondiente al genoma AAV CAG posee, en primer lugar, el promotor CAG que es más grande que el CMV y, además, secuencias de estabilización del mRNA para aumentar la expresión como es el caso de la secuencia WPRE. Esto hace que el genoma generado sea ligeramente mayor a la capacidad de encapsidación de un vector AAV y, por tanto, la productividad obtenida sea inferior a la esperada.

3.2.2. Caracterización *in vitro* de los vectores adenoasociados

Una vez producidos los vectores, se procedió a su caracterización. Para ello, se infectaron *in vitro* células HEK-293 (no permisivas a la replicación de vectores AAVs) a una cantidad de 50.000 vg/cel y se esperó 72 horas para la extracción del mRNA (Figura 27). Cabe destacar que los vectores AAVs infectan de manera muy ineficiente *in vitro* y es por esta razón que la dosis utilizada es tan elevada. Como control se utilizó un virus AAV 2/9 CMV GFP a la misma dosis.

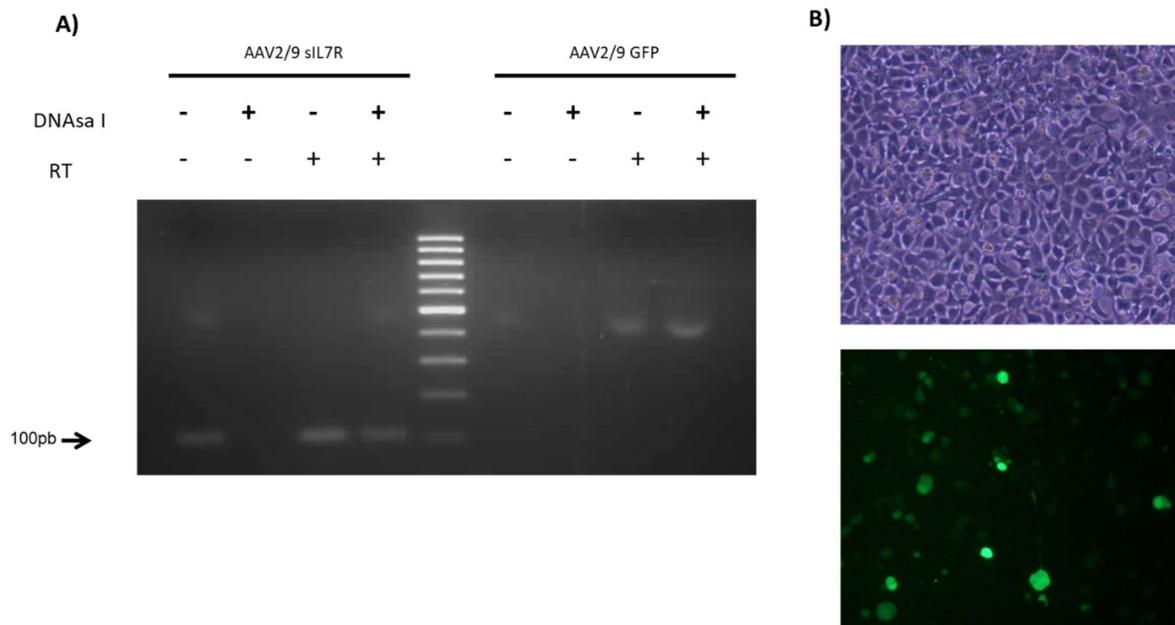


Figura 27. A) PCR con *primers* específicos para siL-7R de extracciones de RNA de células HEK-293 no permisivas para la replicación de vectores AAV infectadas con 50.000 vg/cel de vectores AAV2/9 siL-7R y AAV2/9 GFP durante 72 horas. **B)** Micrografía de campo claro y con filtro de fluorescencia en el momento de la recogida correspondiente a la infección con AAV2/9 GFP.

Debido a la cantidad tan elevada de genomas por célula y que estos tienen bajo peso molecular, la mayoría de métodos de extracción de mRNA extraen, también, parte de los genomas virales. Así, en el primer carril de la figura 27 A aparece amplificación incluso cuando no se añade retrotranscriptasa. Esto se debe a que el

primer paso del ciclo viral de un vector AAV es la generación de la segunda cadena del DNA. Este fenómeno se soluciona tratando las muestras con DNAsa I antes de la retrotranscripción, para así eliminar los genomas virales y que únicamente se amplifiquen los mRNAs una vez retrotranscritos. Se puede observar como en el segundo carril, la señal de amplificación desaparece al aplicar DNAsa I y, por tanto, que la señal observada en el último carril (DNAsa I + RT) corresponde a la presencia real de mRNA en la muestra. Así pues, se demuestra que el vector AAV portador del transgén sIL-7R no solo es capaz de entrar en las células sino que también es capaz de expresar el transgén *in vitro*.

Del mismo modo que para el vector AAV2/9 CMV sIL-7R, también se comprobó la infectividad del vector AAV2/8 CMV sIL-23R previamente clonado en el laboratorio (Figura 28).

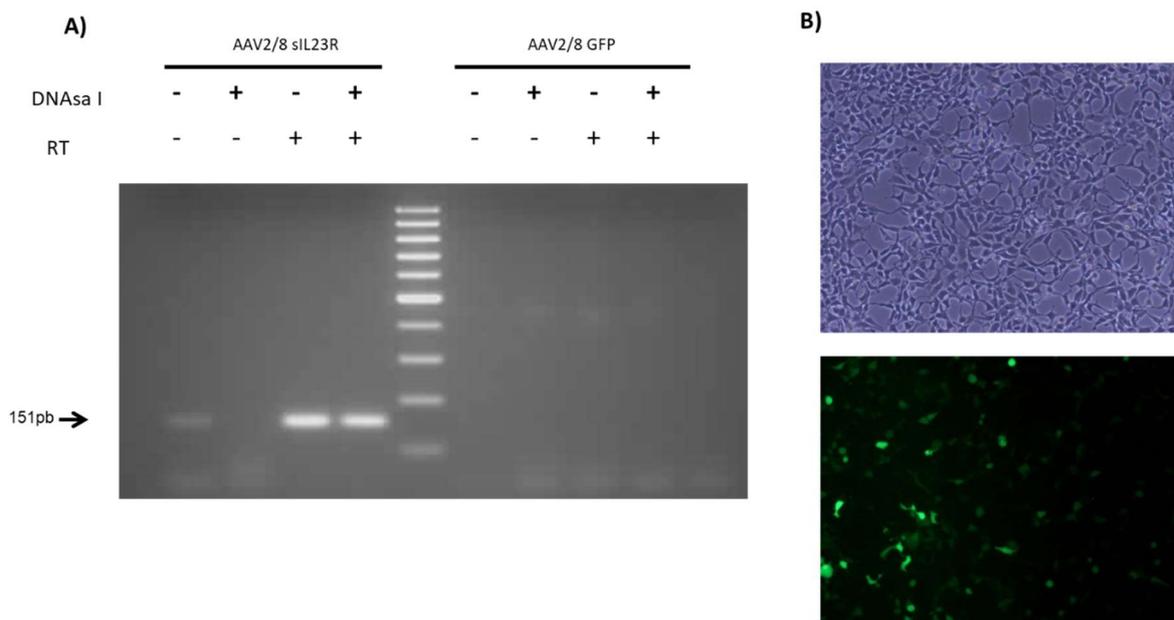


Figura 28. PCR con *primers* específicos para sIL-23R de extracciones de RNA de células HEK-293 no permisivas para la replicación de vectores AAV infectadas con 50.000 vg/cel de vectores AAV2/8 sIL-23R y AAV2/8 GFP durante 72 horas. **B)** Micrografía de campo claro y con filtro de fluorescencia en el momento de la recogida correspondiente a la infección con AAV2/8 GFP.

Tal y como se observa en la figura 28, el vector AAV portador del transgén sIL-23R, también expresa el transgén correspondiente. También se puede observar la

ausencia de amplificación en todos los carriles correspondientes a muestras infectadas con vector GFP, demostrando que las parejas de *primers* utilizados son específicos para los transgenes sintetizados y no amplifican otras secuencias de manera inespecífica.

En la figura 29 se muestra la PCR correspondiente a muestras de RNA extraídas de células HEK-293 infectadas con el vector AAV2/8 sIL-23R-sIL-7R. Se observa amplificación al tratar las muestras con DNAsa I y retrotranscriptasa mientras que no aparece señal en las extracciones de células infectadas con un vector irrelevante (AAV2/8 GFP). Por tanto, al igual que ocurre con el resto de vectores portadores de receptores solubles simples, el vector AAV2/8 sIL-23R-sIL-7R generado también es capaz de expresar el transgén correspondiente.

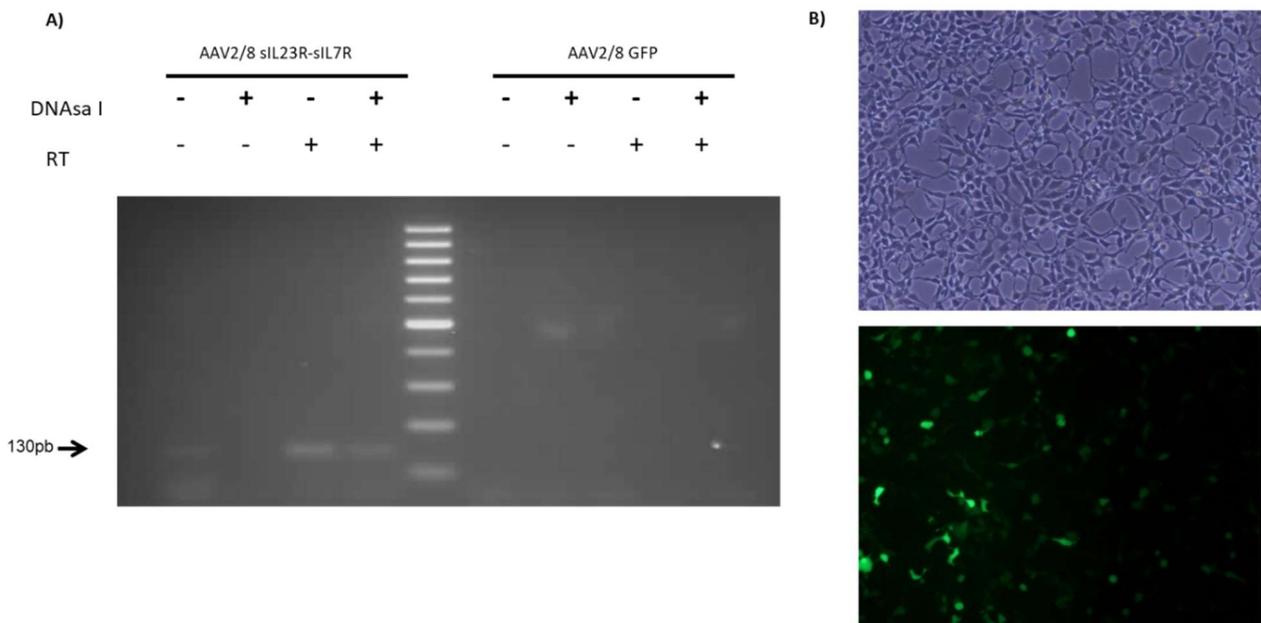


Figura 29. A) PCR con *primers* específicos para sIL-23R-sIL-7R de extracciones de RNA de células HEK-293 infectadas con 50000 vg/cel de vectores AAV2/8 sIL-23R-sIL-7R y AAV2/8 GFP durante 72 horas. **B)** Micrografía de campo claro y con filtro de fluorescencia en el momento de la recogida correspondiente a la infección con AAV2/8 GFP.

3.2.3. Caracterización *in vivo* de los vectores adenoasociados

Finalmente, el último paso para la caracterización de los vectores fue su utilización *in vivo*. Para ello, se administraron a ratones C57BL6/J de dos meses de edad a través de la vía intravenosa. Se utilizaron vectores AAV2/8 portadores de los transgenes sIL-7R, sIL-23R y sIL-23R-sIL-7R a dosis elevadas (5×10^{11} vg/animal) y se recogieron muestras de hígado y cerebro dos meses después de la administración (Figura 30).

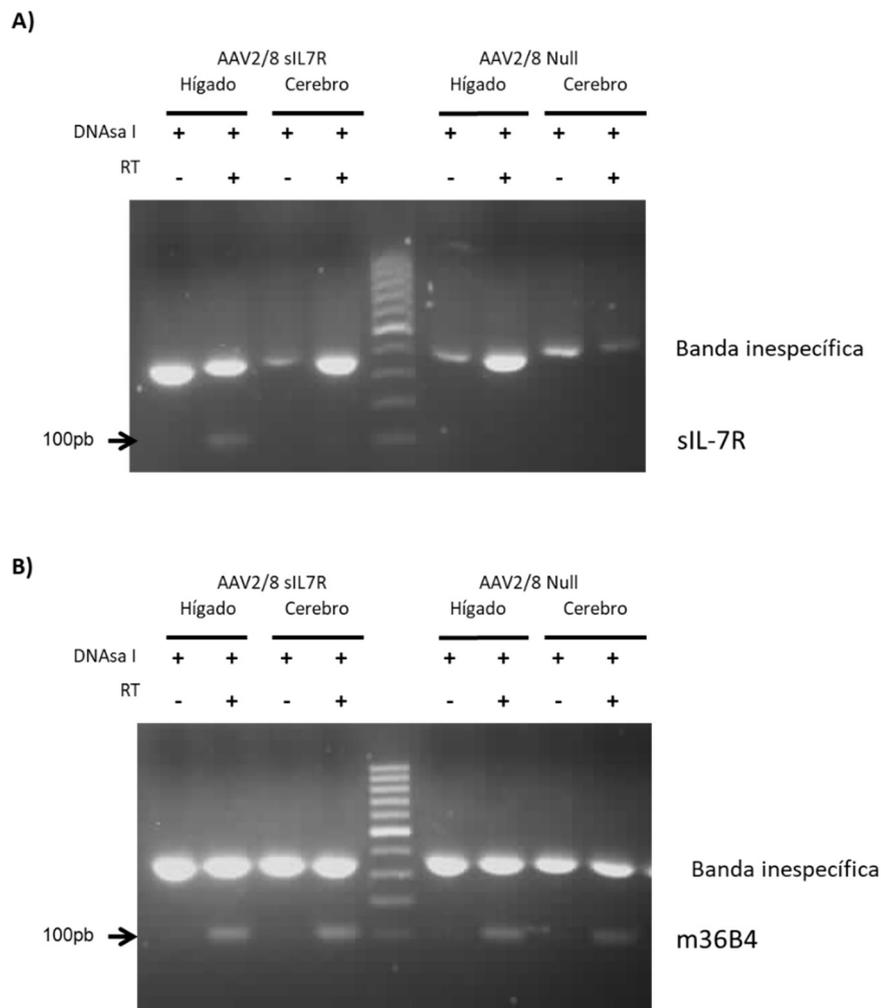


Figura 30. PCR con *primers* específicos para sIL-7R **(A)** de extracciones de RNA de hígado y cerebro de ratones C57BL6/J inyectados con AAV2/8 sIL-7R y AAV2/8 *Null* a una dosis de 5×10^{11} vg/animal. Animales eutanasiados 60 días post-administración. **(B)** PCRs con *primers* para m36B4, como gen de referencia.

El hígado es el principal órgano transducido por los AAVs del serotipo 8 de manera que se analizó la expresión de los transgenes tanto en hígado (órgano diana) como en un órgano donde no debería observarse transducción (cerebro). Al extraerse, las muestras, se trataron con DNasa I del mismo modo que en los ensayos *in vitro* y se analizó por PCR la expresión de los transgenes. En la figura 30 se muestran los resultados para el vector AAV2/8 sIL-7R pudiéndose comprobar como el vector utilizado es capaz de transducir hepatocitos y expresar el transgén. Además, la señal específica no aparece en muestras de cerebro ya que este serotipo no es capaz de atravesar la BHE. Como control para la retrotranscripción y la posterior PCR se utilizó el gen de referencia m36B4 que aparece expresado tanto en hígado como en cerebro (Figura 30 B).

En el caso del vector portador de sIL-23R (Figura 31), se analizó la expresión únicamente en hígado ya que sabíamos que el vector no llegaría al SNC. Igual que lo observado en el caso de sIL-7R, el vector AAV2/8 portador de sIL-23R también es capaz de expresar el transgén *in vivo* y la detección es específica ya que en ninguno de los casos se observa amplificaciones en las muestras de animales administrados con AAV2/8 *Null*.

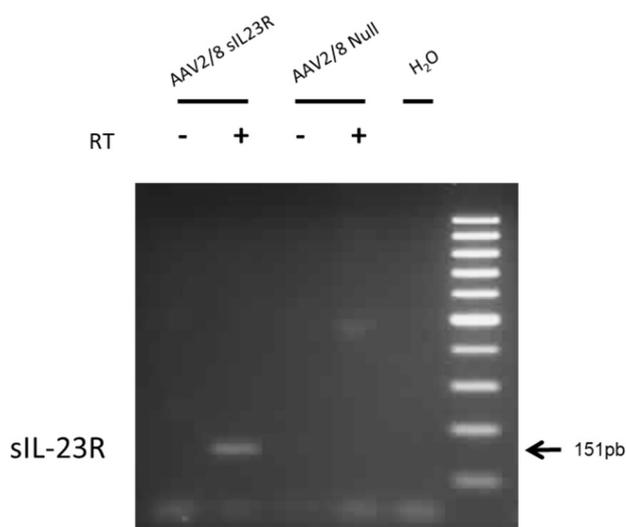


Figura 31. PCR con *primers* específicos para sIL-23R de extracciones de RNA de hígado de ratones C57BL6/J inyectados con AAV2/8 sIL-23R y AAV2/8 *Null* a una dosis de 5×10^{11} vg/animal. Animales eutanasiados 54 días post-administración.

En la figura 32 se puede observar que los animales inyectados con AAV2/8 sIL-23R-sIL-7R presentan amplificación específica cuando las muestras se tratan con retrotranscriptasa mientras que la señal no aparece cuando la muestra no se retrotranscribe. Además, no se observa amplificación en ninguna muestra de aquellos animales administrados con el vector AAV *Null*. Se puede concluir, por tanto, que el vector AAV2/8 sIL-23R-sIL-7R es capaz de transducir las células hepáticas *in vivo* y expresar el transgén correspondiente.

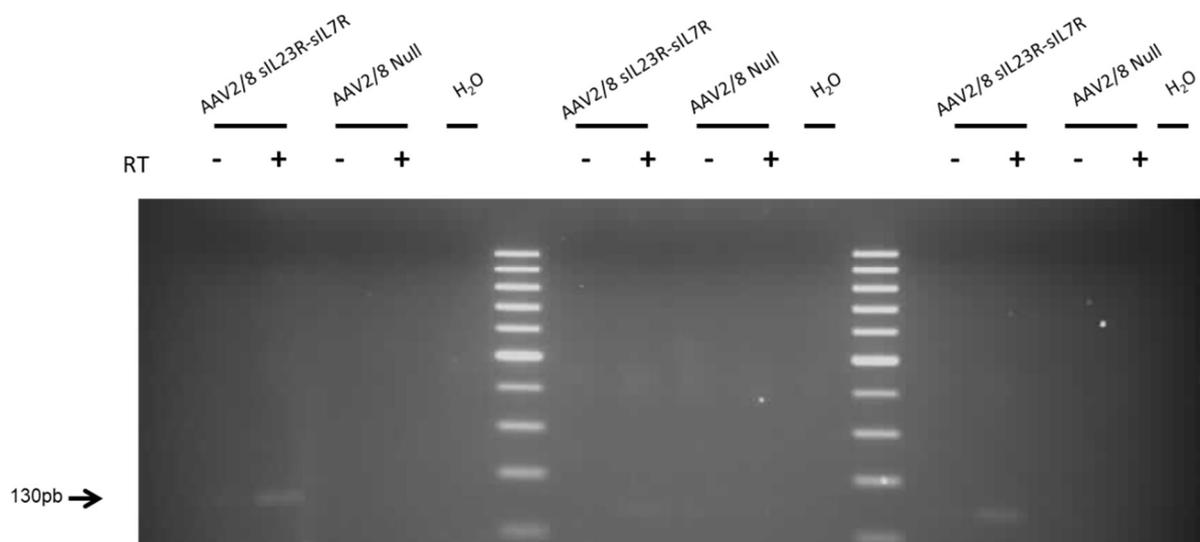


Figura 32. PCR con *primers* específicos para sIL-23R-sIL-7R de extracciones de RNA de hígado de ratones C57BL6/J inyectados con AAV2/8 sIL-23R-sIL-7R y AAV2/8 *Null* a una dosis de 5×10^{11} vg/animal. Animales eutanasiados dos meses post-administración.

4. INTERACCIÓN *IN VITRO* ENTRE sIL-23R E IL-23

4.1. Puesta a punto del cultivo primario de esplenocitos

La hipótesis principal de esta tesis es que los receptores solubles son capaces de bloquear las citoquinas impidiendo, así, la interacción con el receptor transmembrana. Puesto que los receptores sIL-7R y sIL-23R utilizados en este trabajo fueron generados sintéticamente, se decidió estudiar su funcionalidad *in vitro*.

Para realizar experimentos *in vitro* que implican receptores y citoquinas murinas es necesario trabajar con células que expresan dichos receptores de manera endógena y que éstos sean capaces de interactuar con las citoquinas correspondientes. Debido a que no se encontró ninguna línea celular estable que expresara el receptor de IL-23, se utilizaron cultivos primarios de bazo para estudiar el posible efecto del receptor soluble sobre la señalización celular.

Las suspensiones de células de bazo o suspensiones de esplenocitos son cultivos primarios de bazo formados principalmente por linfocitos. Estos cultivos presentan una vida muy corta cuando no reciben señales de supervivencia, de manera que el primer paso fue comprobar la supervivencia celular en diferentes condiciones de cultivo para poner a punto las condiciones de los posteriores experimentos de señalización.

En todos los casos observamos como el cultivo perdía la mitad de las células viables al cabo de un día y a los dos días aproximadamente el 90% de las células (Figura 33). Se optó, por tanto, por realizar los experimentos *in vitro* el mismo día en que se extraían los bazos y se ponían las células en cultivo.

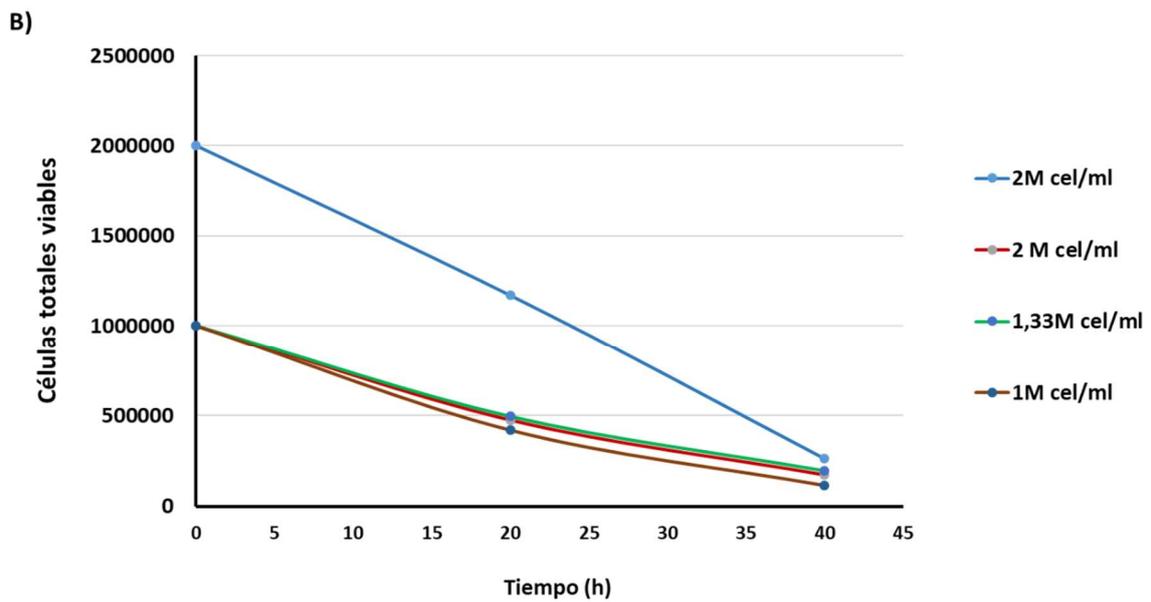
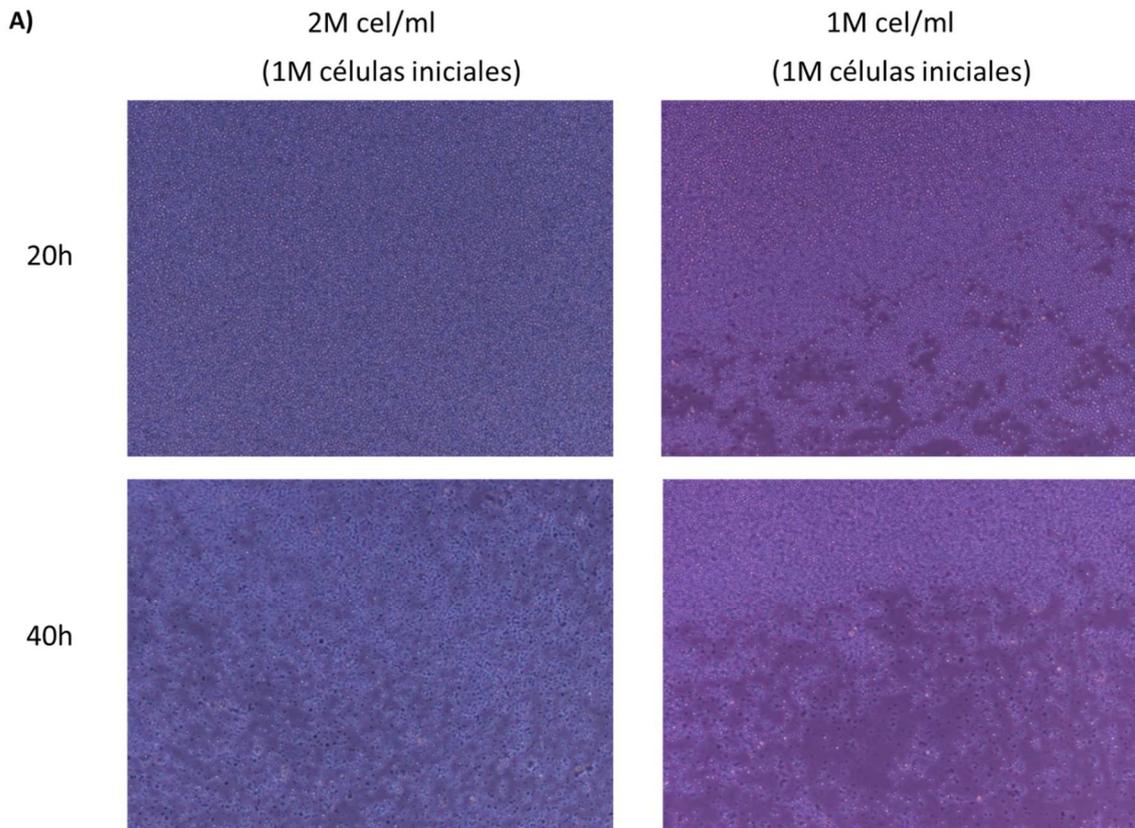


Figura 33. Cultivo primario de esplenocitos utilizando de diferentes concentraciones de células (2×10^6 , 1.33×10^6 y 1×10^6 células/ml) **(A)**. Viabilidad celular **(B)**. M: millones; cel: células

4.2. Bloqueo de la actividad de IL-23 mediante sIL-23R

La capacidad del receptor sIL-23R de unir la citoquina y, por tanto, de impedir la señalización de la vía de IL-23 se comprobó utilizando cultivos primarios de esplenocitos e IL-23 recombinante.

Tal y como se demuestra en la figura 34, la fosforilación de STAT3 producida por la presencia de IL-23 en el medio de cultivo desaparece cuando se utiliza medio condicionado con sIL-23R. De hecho, los niveles de fosforilación son los mismos que presentan las células en estado basal cuando no son estimuladas con la IL-23.

Se puede concluir que el receptor sIL-23R generado es capaz de unir la IL-23 y bloquear su unión al receptor bloqueando la señalización *in vitro*.

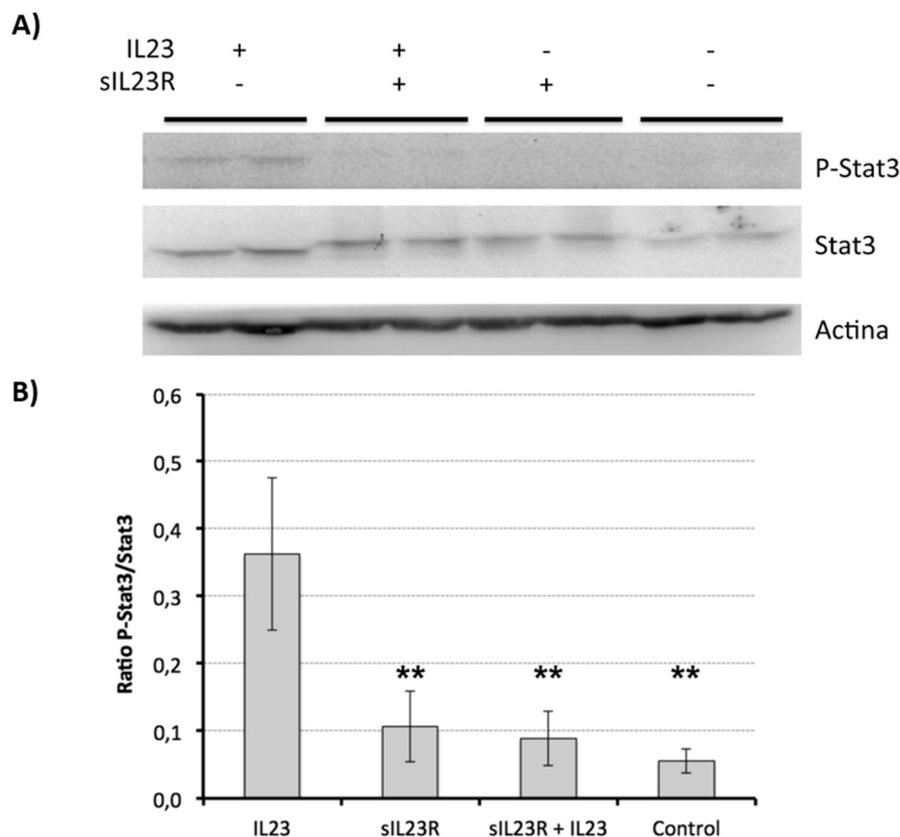


Figura 34. Bloqueo de la señalización de IL-23/IL-23R a través del receptor soluble sIL-23R en cultivos primarios de esplenocitos incubados durante 5 minutos con 10 ng/ml de IL-23 pre-incubado con medio condicionado con sIL-23R durante 1 hora. **A)** Western blot representativo anti STAT3 fosforilado (p-STAT3) y STAT3 de extracciones de proteína de los cultivos de esplenocitos. Se muestra también la actina como control de carga. **B)** Cuantificación del ratio p-STAT3/STAT3 normalizado con la actina de cuatro experimentos independientes (n= 2 ó 3 por experimento). **p<0.01

5. INTERACCIÓN IN VITRO ENTRE sIL-7R E IL-7

El primer paso para demostrar la funcionalidad del receptor de IL-23 fue confirmar la interacción, *in vitro*, del receptor generado por síntesis con su citoquina correspondiente mediante la técnica del *pull-down* (Miralles et al., 2017). Por otro lado, también se quiso averiguar si la proteína de fusión sIL-23R-sIL-7R era capaz de interactuar con sus citoquinas correspondientes.

5.1. Clonación de los genes sIL-7R y sIL-23R-sIL-7R en proteínas de fusión GST

En primer lugar, se clonaron los genes sIL-7R y sIL-23R-sIL-7R en plásmidos de expresión con GST mediante digestión con enzimas de restricción seguida de ligación (Figura 35). Se utilizaron como vectores receptores tanto un plásmido de expresión para células eucariotas (pEBG-2T) como un plásmido de expresión para células procariontas (pGEX).

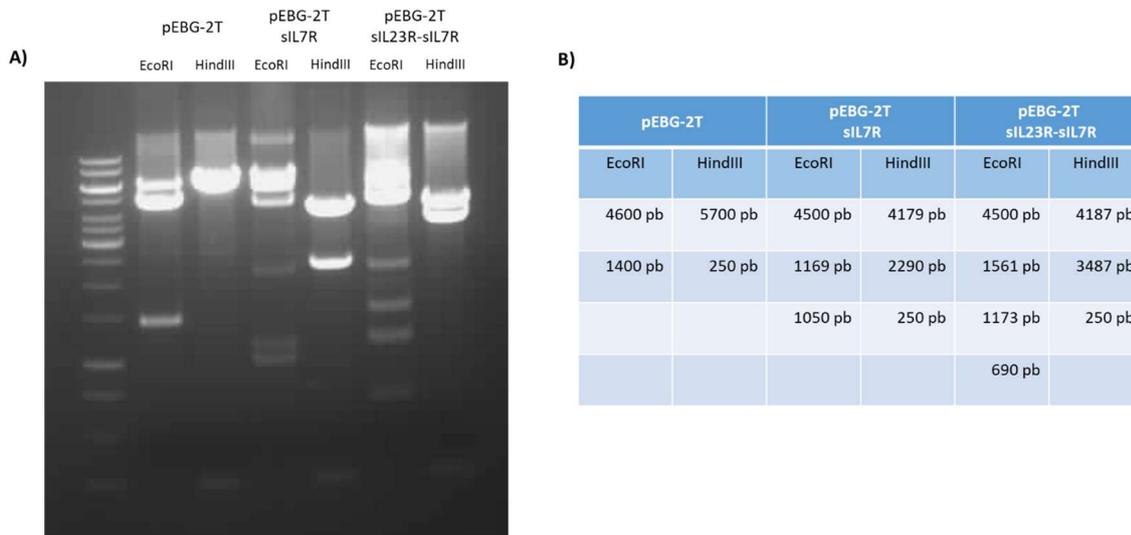


Figura 35. Comprobación de los plásmidos pEBG-2T sIL-7R y pEBG-2T sIL-23R-sIL-7R. **(A)** Gel de agarosa 1% para comprobar las bandas de digestión. **(B)** Patrón de bandas esperado para cada plásmido.

5.2. Generación de un anticuerpo contra la región extracelular del receptor IL-7R

El *pull-down* es una técnica basada en la purificación de una proteína conjuntamente con las proteínas con las que interacciona. Una vez realizada la purificación, se demuestra la presencia de los diferentes elementos por western-blot. Debido a que los anticuerpos comerciales para el IL-7R están generados contra la región intracelular del receptor, y nuestro sIL-7R no contiene dicha región intracelular, se decidió generar un antisuero contra una región antigénica del sIL-7R.

Con la ayuda de diferentes plataformas de predicción, se seleccionó una región candidata para la síntesis de un péptido (DDHSFWCHSQLE) que, posteriormente, se utilizó para inmunizar conejos para obtener un antisuero (Figura 36).

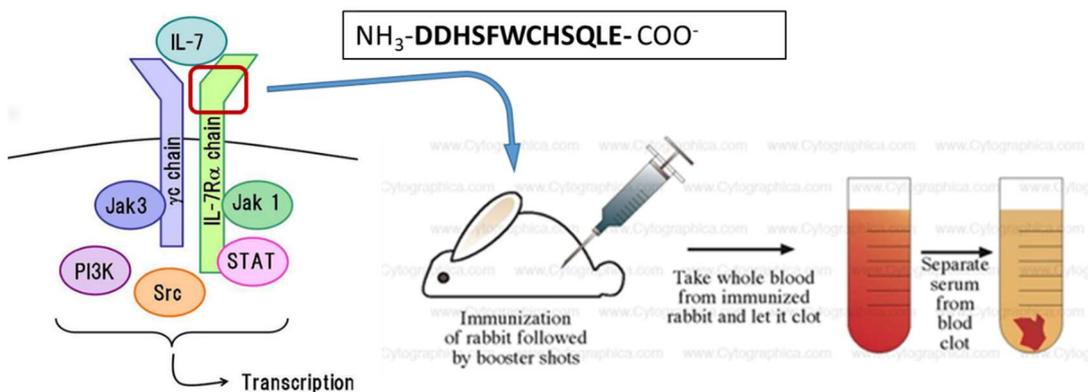


Figura 36. Estrategia de generación de un anticuerpo anti-IL-7R capaz de reconocer la región extracelular.

Se solicitó el antisuero a la empresa EZBiolabs y se analizó su especificidad. Para ello, se utilizaron células HEK-293 infectadas con vectores adenovirales portadores de diferentes formas del receptor (IL-7R, sIL-7R y sIL-23R-sIL-7R) a una MOI de 10.

En la figura 37 A se muestra el *western blot* utilizando el antisuero anti-IL-7R sobre células infectadas con vectores adenovirales portadores de las diferentes formas del receptor. Aparecen gran cantidad de bandas inespecíficas de manera que no resulta útil para el estudio de los receptores sin purificación. Paralelamente, se transfectaron células HEK-293 con los plásmidos de expresión eucariotas pEBG-2T sIL-7R y pEBG-2T sIL-23R-sIL-7R y se purificaron las proteínas GST utilizando *glutathione sepharose*. En la figura 37 B se muestra el *western blot* utilizando como muestra proteínas purificadas. En este caso, el anticuerpo anti-GST comercial sí que reconoce los diferentes receptores IL-7R, pero el anticuerpo anti-IL-7R generado no fue capaz de reconocer los receptores correspondientes, por lo que se descartó su uso para el ensayo de *pull-down*. A partir de este momento, se optó por la utilización del anticuerpo anti-GST para demostrar la presencia de los diferentes receptores.

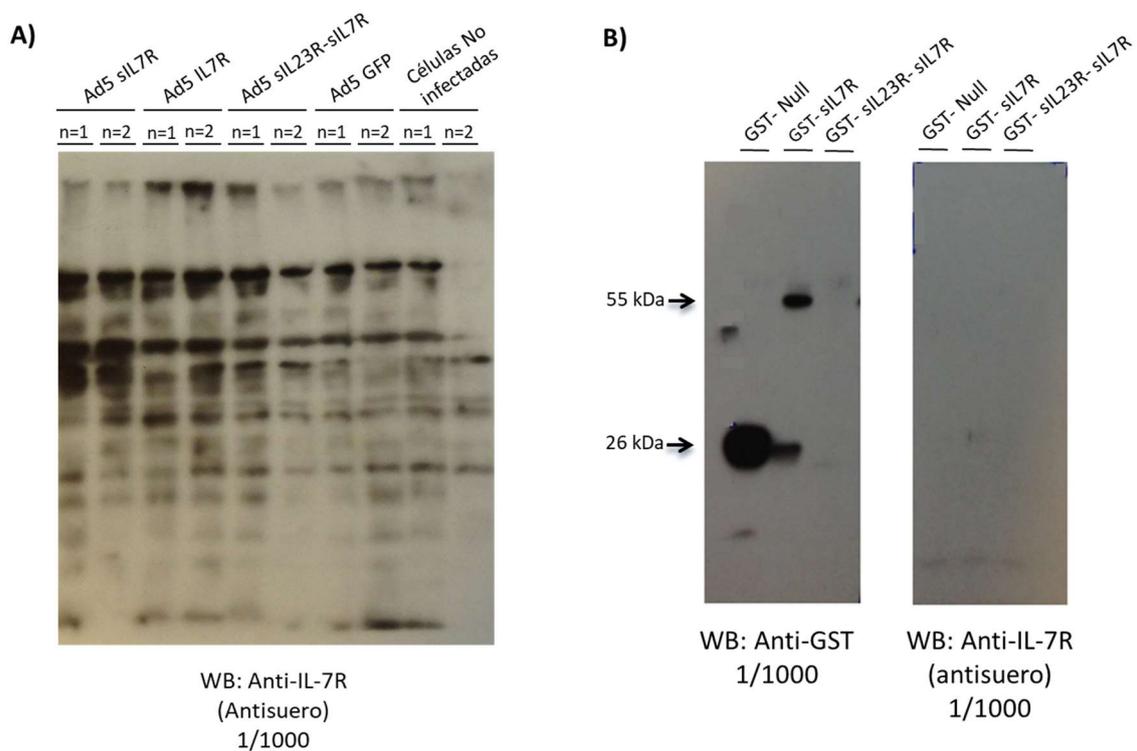


Figura 37. *Western blot* anti-IL-7R de 10µg de proteína total de células HEK-293 infectadas con diferentes formas de IL-7R a MOI 10 **(A)** y de proteínas GST purificadas con *glutathione sepharose* **(B)**.

5.3. Producción de proteínas GST en eucariotas para ensayos de interacción

El siguiente paso para la realización del ensayo de *pull-down* fue la producción a gran escala de proteínas. Se optó por la utilización de células eucariotas debido a que resulta más aproximado a una situación *in vivo* donde las regiones extracelulares de los receptores contienen gran cantidad de modificaciones post-traduccionales.

Con el objetivo de producir una cantidad de proteína suficiente para el ensayo, se transfectaron $1,5 \times 10^7$ células HEK-293 con cada plásmido (pEBG-2T, pEBG-2T sIL-7R y pEBG-2T sIL-23R-sIL-7R) y se extrajeron las proteínas al cabo de 48 horas post-transfección. Posteriormente, se purificó cada extracción con *glutathione sepharose* y se analizó la presencia de proteínas de fusión GST por *western blot*.

En la figura 38 se muestra que la proteína GST-sIL-7R se produce y tiene el tamaño esperado (55 kDa). Por el contrario, en el caso de la proteína de fusión GST-sIL-23R-sIL-7R, aparece una banda minoritaria de 98 kDa correspondiente al tamaño de la triple proteína de fusión y una banda mayoritaria de aproximadamente 75 kDa posiblemente correspondiente a la fragmentación de un fragmento GST-sIL-23R (detectable con anticuerpo anti-GST) y el fragmento sIL-7R por separado (no detectable).

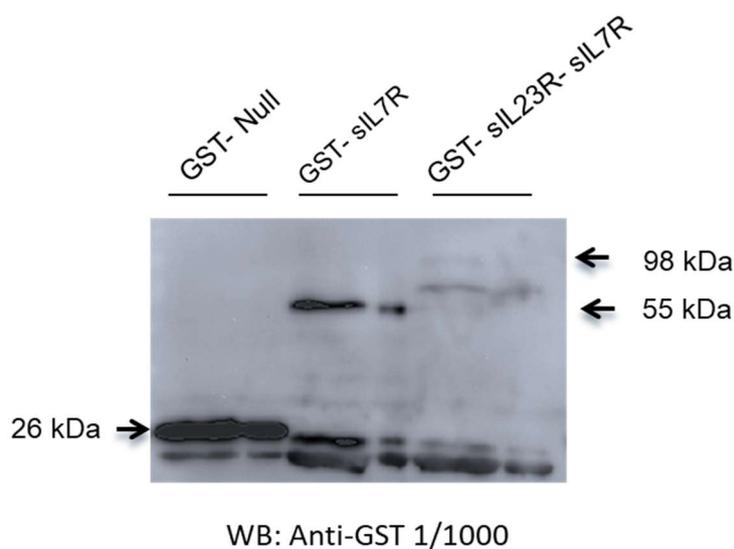


Figura 38. *Western blot* anti-GST de extractos proteicos de $1,5 \times 10^7$ células HEK-293 transfectadas con GST, GST-sIL-7R y GST-sIL-23R-sIL-7R purificados con *glutathione sepharose*.

5.4. Producción de proteínas GST en procariotas para ensayos de interacción

Debido a que la producción en células eucariotas generaba cantidades insuficientes para ensayos de interacción, se decidió producir las diferentes proteínas GST en procariotas. La producción en procariotas, además de ser más fácilmente escalable, no requiere de transfección de una gran cantidad de células y, por tanto, resulta un método mucho más fácil y sencillo para la obtención de grandes cantidades de proteínas.

En primer lugar, se transformaron células BL21 con los plásmidos portadores de las diferentes formas de los receptores (pGEX, pGEX sIL-7R y pGEX sIL-23R-sIL-7R) y se crecieron los cultivos con ampicilina y cloranfenicol para su selección. Una vez obtenida una colonia portadora de cada plásmido, se inocularon cultivos líquidos (LB Ampicilina+cloranfenicol) de 60 mL cada uno para poner a punto las condiciones de producción. Se probaron tres condiciones de inducción con IPTG para cada proteína (1 h a 37°C, 3 h a 37°C y durante la noche (O/N) a 28°C) y se procedió a su purificación con *glutathione sepharose*. En todos los casos, se separaron alícuotas a diferentes momentos para seguir el proceso de purificación y se corrieron en un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie (Figura 39).

Del mismo modo que ocurre cuando se produce en células eucariotas, la proteína GST-Null se produce en mayores cantidades que las proteínas de fusión. Además, se evidencian diferencias a distintos tiempos de producción. Por otro lado, cuando se aumenta el tiempo de producción para la generación de proteínas GST-sIL-7R y GST-sIL-23R-sIL-7R aparecen proteínas cada vez más fragmentadas. Así pues, se decidió que las condiciones óptimas para la producción de proteínas GST en procariotas correspondían a 1 hora a 37°C y se procedió a su producción a gran escala para obtener cantidades suficientes para los ensayos de interacción.

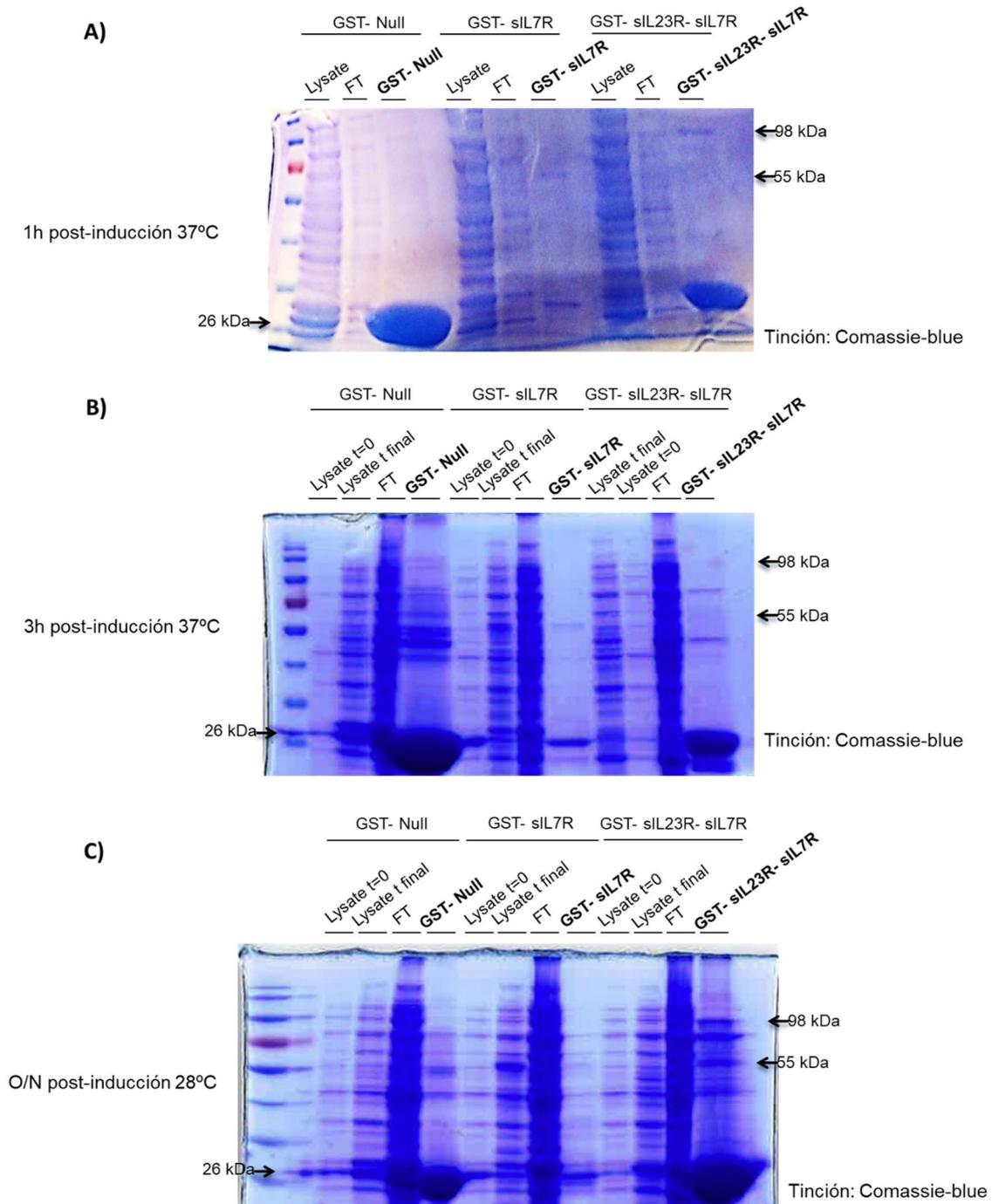


Figura 39. Producción de proteínas de fusión GST a diferentes tiempos de inducción con IPTG: 1 h a 37°C (A), 3 h a 37°C (B) y O/N a 28°C (C). Muestras: Lysate t=0 (cultivo sin inducir), Lysate t final (cultivo sin purificar), FT (fracción no unida a la resina).

En la figura 40 se puede observar como la proteína GST-sIL-7R tiene el tamaño esperado, mientras que la triple proteína de fusión GST-sIL-23R-sIL-7R aparece fragmentada. Así pues, debido a que en todos los casos ensayados la proteína GST-sIL-23R-sIL-7R aparece fragmentada en mayor proporción que entera, se decide descartar la proteína producida en bacterias para los ensayos de interacción.

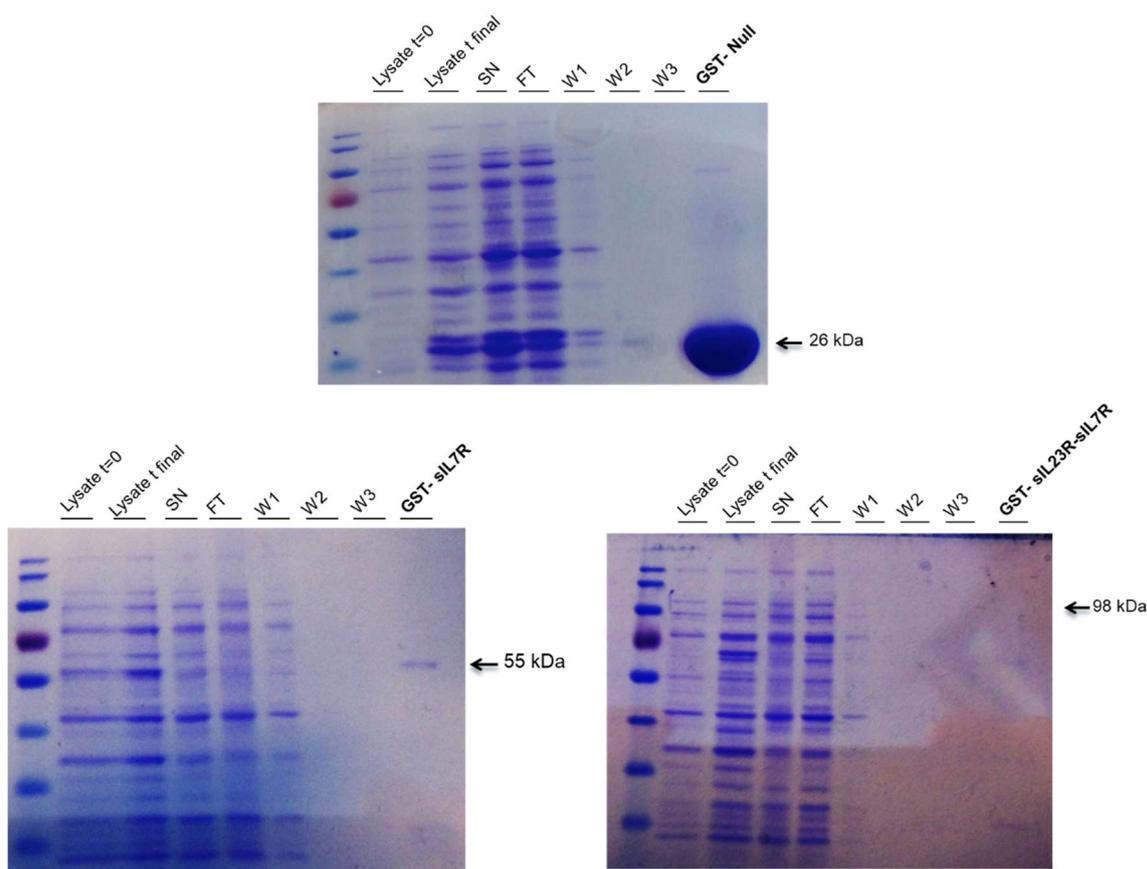


Figura 40. Producción de proteínas de fusión GST [(A) GST-Null; (B) GST-sIL-7R; (C) GST-sIL-23R-sIL-7R] en bacterias BL21 a gran escala (250 ml LB+ampicilina+cloranfenicol) tras una inducción de 1 h a 37°C. Se representan los diferentes pasos del proceso de producción (1% del volumen total) en un gel de acrilamida teñido con azul de Comassie. Muestras: Lysate t=0 (cultivo sin inducir), Lysate t final (cultivo sin purificar), SN (sobrenadante en contacto con la resina), FT (fracción no unida a la resina), W1, W2 y W3 (lavados 1, 2 y 3), GST-X (fracción eluida).

5.5. Puesta a punto del anticuerpo anti-IL-7

El siguiente paso necesario para la demostración de la interacción entre los diferentes receptores solubles con las citoquinas correspondientes es poner a punto la detección de la IL-7 por *western blot*. Para ello, se realizaron extracciones de bazo y músculos de ratones C57BL/6J wild-type y se cargaron en geles de poliacrilamida para *western blot*. Se utilizó el bazo como control positivo y el músculo como control negativo. Por otro lado, se realizó un *western blot* utilizando diferentes cantidades de IL-7 recombinante de ratón para determinar la cantidad óptima para los ensayos de *pull-down* (Figura 41).

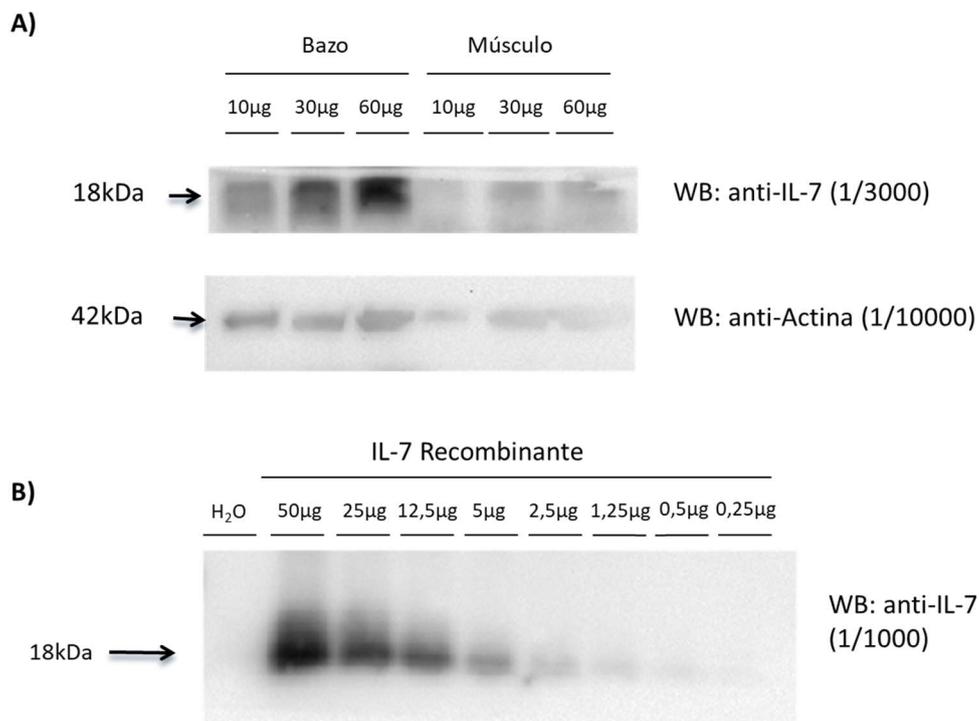


Figura 41. Puesta a punto del anticuerpo anti-IL-7. *Western blot* anti-IL-7 en muestras de bazo y músculo **(A)** y sobre IL-7 recombinante murina **(B)**.

Por último, se deberían poner a punto las condiciones para el *pull-down* entre el sIL-7R generado y la IL-7. No obstante, por cuestiones de tiempo queda pendiente para futuros trabajos.

6. APROXIMACIÓN TERAPÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DE LA EAE MEDIANTE VECTORES DE TERAPIA GÉNICA PORTADORES DE RECEPTORES SOLUBLES

6.1. Efecto de la administración de vectores virales en ratones EAE

La administración de vectores virales durante el desarrollo de la EAE puede conllevar problemas derivados del hecho de introducir elementos que interactúan con el sistema inmune en un momento donde éste se encuentra activado debido a la inmunización de los animales para la inducción de la enfermedad. De hecho, en un estudio preliminar del grupo, se observó que la administración de adenovirus de primera generación durante los días posteriores a la inmunización con MOG producía la muerte de los ratones por *shock*. Para evitar la muerte por *shock*, se optó por una estrategia preventiva administrando los vectores adenovirales una semana antes de la inmunización con MOG. No obstante, debido a que los vectores adenovirales utilizados no eran vectores *gutless* y, por tanto, poseen y expresan proteínas virales, estos eran eliminados del organismo entre las semanas 2 y 3 post administración impidiendo la observación de un efecto por parte de la proteína terapéutica. Así pues, se optó por la utilización de vectores AAVs para este trabajo.

Los vectores AAVs activan de manera leve el sistema inmune después de su administración y, por tanto, el primer paso fue comprobar si la administración de vectores AAVs durante el transcurso de la EAE era o no posible. Para ello, se utilizaron vectores AAV2/8 con la proteína β -galactosidasa (β gal) como gen marcador. Se administraron dosis elevadas (5×10^{11} vg/animal) durante los días cercanos a la inducción de la EAE a través de la vía intravenosa y se estudió su efecto en el curso clínico de la EAE.

El experimento se diseñó con cuatro grupos, de los cuales dos se inyectaron antes de la inducción (días -6 y -2) y dos después de la inducción de la EAE (días +5 y +9). Una vez inducida la enfermedad, se realizó el seguimiento clínico hasta el momento de la eutanasia. Los dos grupos administrados antes de la inducción de la EAE

(grupos β gal -6 y β gal -2) se eutanasiaron el día 13 post-inmunización, mientras que los dos grupos administrados después de la inducción de la EAE (grupos β gal +5 y β gal +9) se eutanasiaron el día 20 post-inmunización (Figura 42).

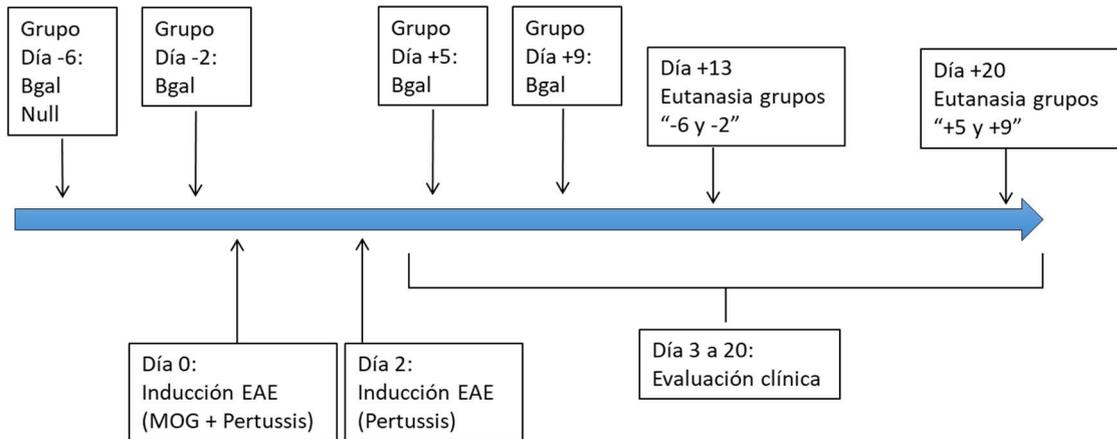


Figura 42. Diseño experimental para determinar el perfil de seguridad de la administración de vectores AAVs durante el desarrollo de la EAE. Contando el día de la inducción de EAE como día "0", se indican los días de administración de vectores AAV2/8 β gal y los días de recogida de muestras de cada grupo.

Posteriormente, se analizaron los niveles de actividad β -galactosidasa en muestras hepáticas teniendo en cuenta que los grupos β gal -2 y β gal +5 presentaban 15 días de expresión siendo estos dos últimos grupos los que presentaban los mismos días de expresión. La actividad β -galactosidasa de los dos grupos adicionales (grupos β gal -6 y β gal +9) se analizó a 19 y 11 días de expresión respectivamente. Estos dos grupos, aunque no contarían con los mismos días de expresión del transgén, servirían para darnos una idea de qué ocurre en caso de alejarnos ligeramente del día de la inducción de la EAE. Se incluyó también un grupo EAE sin tratamiento como control de la enfermedad y un grupo administrado con un AAV *Null* como control de la administración viral. Este último grupo, se administró 6 días antes de la inmunización y fue eutanasiado el día 20 post-inmunización.

Tal y como se observa en la figura 43, no se hallaron diferencias en la evolución clínica entre los grupos controles administrados con el vector *Null* y el grupo EAE (administrado con suero fisiológico). Así pues, se concluye que la administración de un vector viral durante los días previos a la inmunización con MOG, no comporta un efecto sobre el desarrollo de la enfermedad. En la figura 43 B se muestra la evolución del peso de los animales control (grupos EAE y AAV *Null*) donde los animales aumentan de peso hasta el día en que se inicia la enfermedad. Aproximadamente hacia el día 10-12 después de la inmunización con MOG, los animales dejan de ganar peso coincidiendo con los primeros síntomas clínicos de la enfermedad. En ese momento, empiezan a perder peso a medida que se desarrolla la EAE debido a una pérdida de masa muscular asociada a la enfermedad.

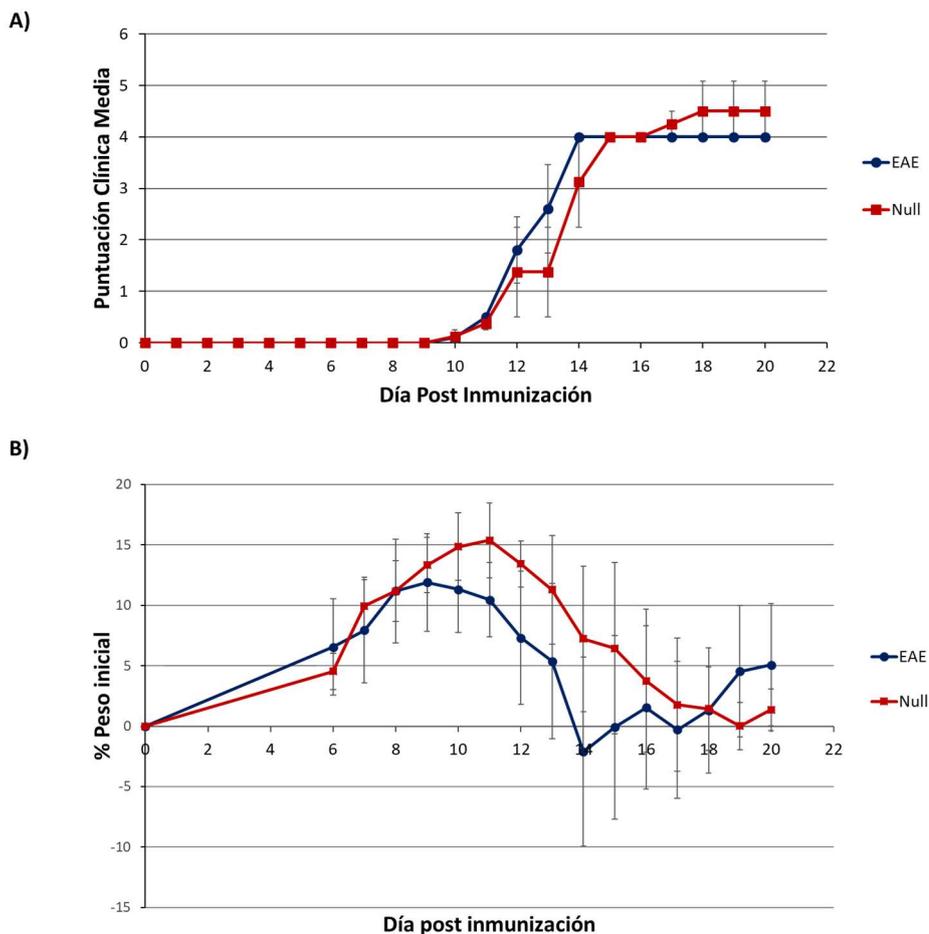


Figura 43. Administración intravenosa de un vector viral AAV *Null* a una dosis de 5×10^{11} vg/animal ($n=5$) en el modelo murino de EAE 6 días antes de la inmunización. **(A)** Seguimiento diario de la puntuación clínica media tras la administración de un vector. **(B)** Seguimiento diario del peso respecto el peso inicial. Las barras de error representan el error estándar.

El seguimiento clínico de todos los grupos administrados con vectores que expresan la proteína β -galactosidasa (Figura 44) indica que la expresión de este transgén no afecta a la evolución clínica de la EAE de manera que se puede utilizar la expresión de β -galactosidasa como gen marcador. Además, la evolución de los pesos de los diferentes grupos no presentó diferencias estadísticas con el grupo control (Figura 45).

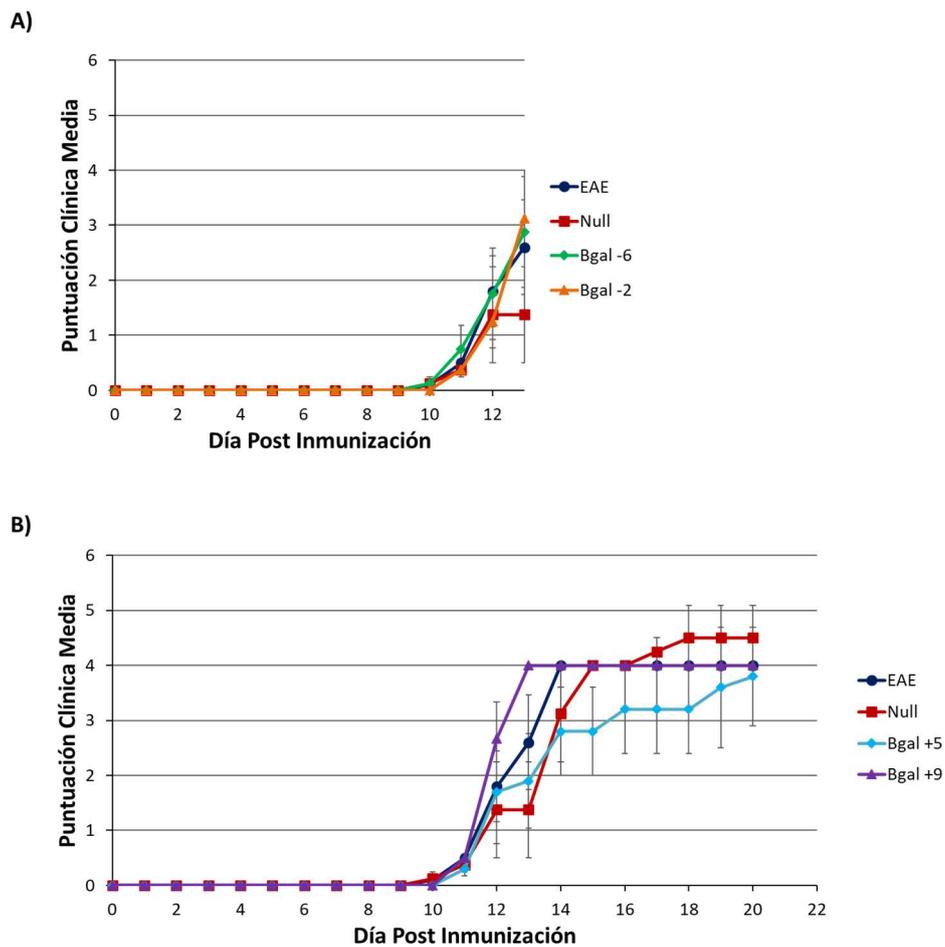


Figura 44. Seguimiento clínico de los grupos administrados vía intravenosa de vectores viral AAV2/8 β -galactosidasa en el modelo murino de EAE. Se administraron 5×10^{11} vg/animal ($n=5$) 6 días y 2 días antes de la inducción **(A)** y 5 días y 9 días después de la inducción **(B)**. Las barras de error representan el error estándar.

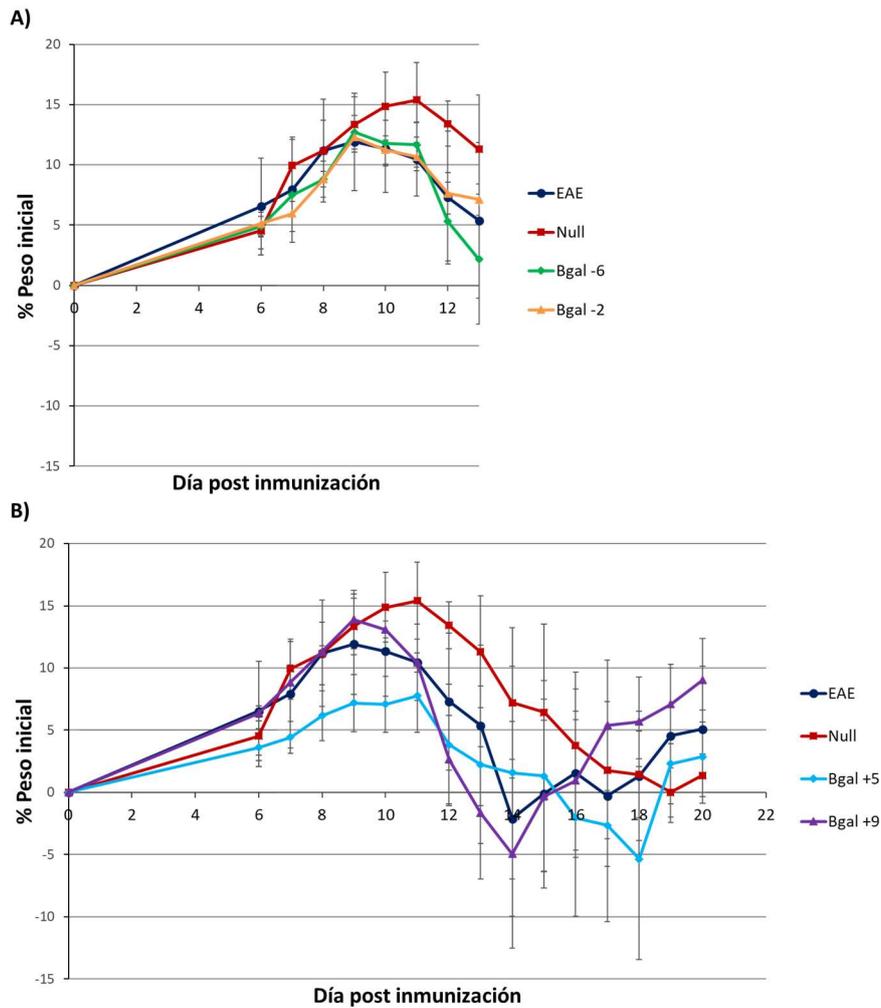


Figura 45. Seguimiento del peso respecto el inicial de los grupos administrados vía intravenosa de vectores viral AAV2/8 β -galactosidasa en el modelo murino de EAE. Se administraron 5×10^{11} vg/animal ($n=5$) 6 días y 2 días antes de la inducción (**A**) y 5 días y 9 días después de la inducción (**B**). Las barras de error representan el error

A diferencia de lo que se sucedió cuando se administraron vectores adenovirales, la supervivencia fue, en todos los grupos, del 100%. Así pues, se puede concluir que se pueden administrar vectores AAVs a dosis elevadas (5×10^{11} vg/animal) en cualquier momento en el modelo de EAE ya sea antes de la inducción de la enfermedad como después. Este hecho, por tanto, permite, a priori, un abordaje curativo en el modelo de EAE.

Posteriormente, se analizaron muestras hepáticas ya que en el caso del vector AAV8, el hígado es un órgano diana cuando se administra vía intravenosa y, por tanto, es donde se espera tener una expresión elevada del transgén.

Tal y como se puede ver en la figura 46, la actividad β -galactosidasa tras 15 días de expresión (grupos -2 y +5) es alrededor de tres veces superior cuando los vectores se administran antes de la inducción de la enfermedad respecto a cuando se administran después de la inducción. Puesto que la actividad β -galactosidasa en estos casos se correlaciona con la cantidad de vectores que han transducido células hepáticas, estos resultados indican que una vez se induce la enfermedad, los vectores administrados vía intravenosa no infectan con la misma eficiencia los hepatocitos respecto a una administración pre-inmunización.

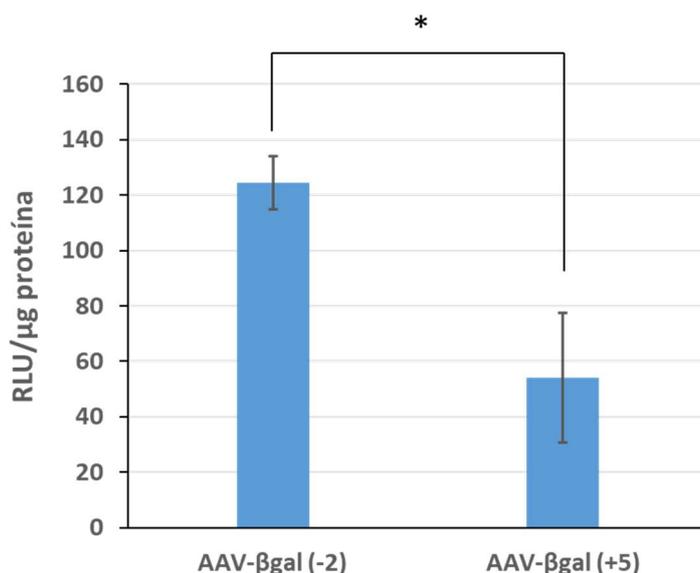


Figura 46. Actividad β -galactosidasa (*Relative Light Units* o RLU/ μ g de proteína total) en muestras de hígado de ratones C57BL/6J EAE administrados con 5×10^{11} vg/animal de vectores AAV- β gal 2 días antes de la inducción con MOG y 5 días post-inducción. Ambos grupos se eutanasiaron 15 días después de la administración de los vectores. * $p < 0.05$

Posteriormente, se analizó la actividad β -galactosidasa en hígado de los grupos administrados a días -6 (previo a la inducción) +9 (post-inmunización) (Figura 47).

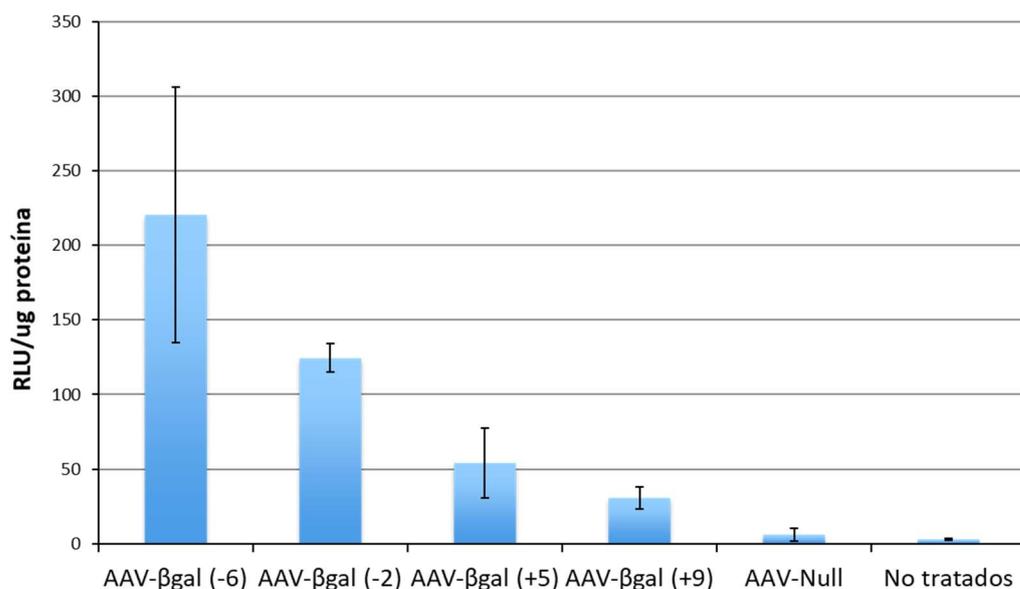


Figura 47. Actividad β-galactosidasa (*Relative Light Units* o RLU/μg de proteína total) en muestras de hígado de ratones C57BL/6J EAE administrados con 5×10^{11} vg/animal de vectores AAV-βgal a diferentes días de la enfermedad (-6, -2, +5 y +9). Se considera día "0" el primer día de la inmunización con MOG.

Cuando se compara la expresión se observa que la presencia del transgén es mayor en los grupos administrados previamente a la inmunización con MOG que en los grupos administrados post-inmunización. Además, cuando se compara la expresión entre los grupos -6 y -2 y entre los grupos +5 y +9 no se observan diferencias significativamente estadísticas indicando que el principal elemento en la reducción de los niveles de expresión de β-galactosidasa es la presencia de una respuesta inmune activada por el proceso de inmunización.

Ya que la expresión del transgén disminuye significativamente cuando se hace la administración tras la inducción de la EAE y teniendo en cuenta que los vectores AAVs alcanzan su máximo nivel de expresión al cabo unas tres semanas post-administración, se decidió administrar los vectores a día -21 para así optimizar la expresión de los diferentes transgenes.

Una vez determinado el día óptimo para la administración, el primer paso fue comprobar si la administración de cápsides virales de AAVs producía un efecto sobre el modelo de EAE cuando se administraban a dosis elevadas 21 días antes de la inmunización con MOG. También se evaluó el efecto de dos dosis virales diferentes para comprobar si había correlación entre dosis y la evolución de la enfermedad. Así, se realizó un experimento utilizando una dosis de 1×10^{11} vg/animal ($n=9$ /grupo) y otro utilizando una dosis de 5×10^{11} vg/animal ($n=14$ /grupo).

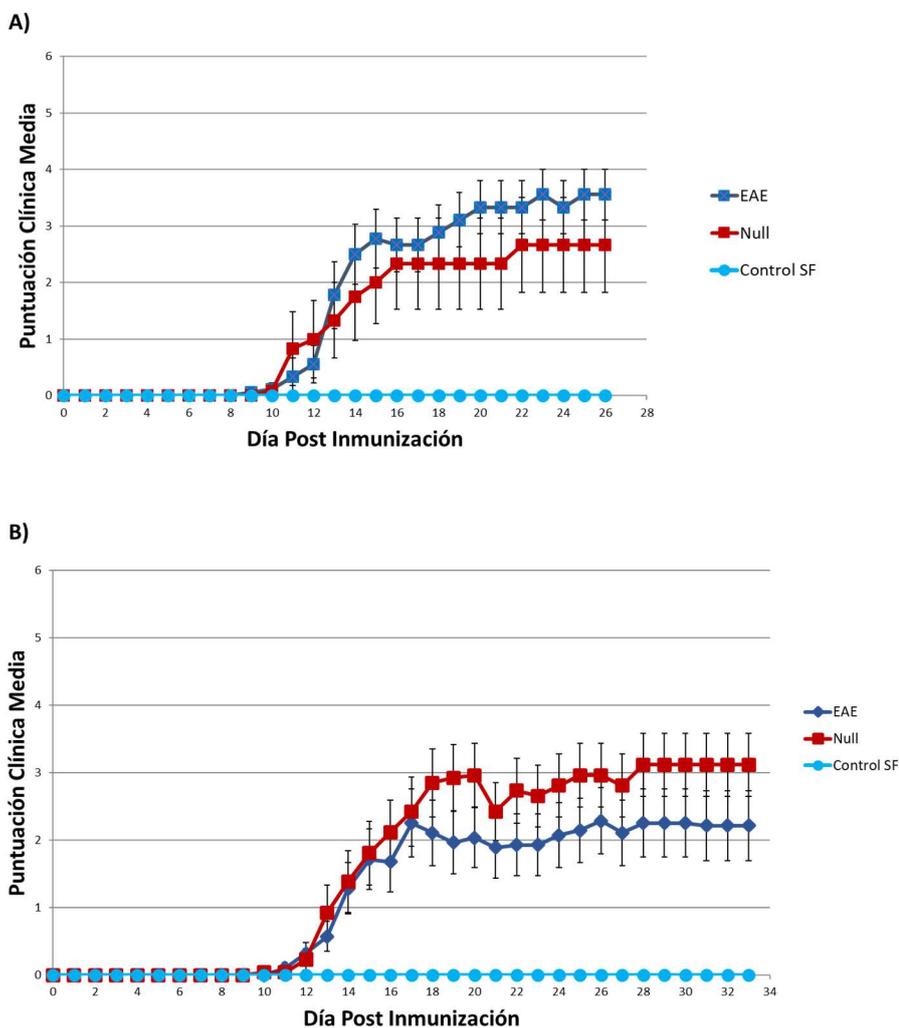


Figura 48. Efecto de la administración intravenosa de un vector viral AAV en el modelo murino de EAE 21 días antes de la inmunización. Seguimiento de la puntuación clínica media tras la administración de un vector AAV *Null* a una dosis de 1×10^{11} vg/animal (**A**) ($n=9$) y 5×10^{11} vg/animal (**B**) ($n=14$) respectivamente. En ambos experimentos, se incluyó un grupo control no inmunizado con MOG (control SF; $n=5$). Las barras de error representan el error estándar.

En la figura 48 se muestra la evolución clínica de los animales administrados con el vector AAV8 *Null* 21 días antes de la inducción de la EAE. Para las dos dosis testadas de vectores AAVs, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con el vector AAV8 *Null* y el grupo control de la enfermedad sin tratamiento (EAE) (Tabla 12). Además, se puede observar que tanto para la dosis de 1×10^{11} vg/animal (Figura 48 A) como para la dosis 5×10^{11} vg/animal (Figura 48 B) los dos grupos presentan el mismo día de inicio y alcanzan la máxima sintomatología el mismo día con una gravedad (puntuación clínica) similar.

Tabla 12. Resumen de las variables clínicas del experimento de la administración intravenosa de los vectores AAV2/8 *Null* a dosis de 1×10^{11} vg/animal (n=7) y 5×10^{11} vg/animal (n=14) en el modelo EAE 21 días antes de la inmunización.

VECTOR	DOSIS (vg/animal)	INCIDENCIA (%)	DÍA INICIO	PUNTUACIÓN CLÍNICA MÁXIMA	PUNTUACIÓN CLÍNICA ACUMULADA
EAE		88,89	12,25 ± 1,49	4,19 ± 0,26	44,00 ± 17,45
AAV8 <i>Null</i>	1×10^{11}	66,67	12,00 ± 1,83	3,40 ± 1,92	43,00 ± 26,35
EAE		78,57	13,55 ± 2,50	2,75 ± 1,91	41,00 ± 33,54
AAV8 <i>Null</i>	5×10^{11}	84,62	13,82 ± 2,71	3,15 ± 1,71	54,62 ± 31,56

Por otro lado, en la figura 49 se muestra la evolución del peso medio de cada grupo y se representa también la evolución del grupo control sano (ratones inmunizados con suero fisiológico en lugar de con el péptido MOG). Este último grupo presenta una evolución normal del peso de manera ascendente desde el inicio del experimento. Por el contrario, los grupos que desarrollan la enfermedad, detienen el incremento de peso cuando la enfermedad se inicia y muestran una pérdida progresiva hasta que la enfermedad alcanza su máxima gravedad (día 15-16). En este momento, los animales comienzan una recuperación progresiva del peso

coincidiendo con la estabilización de la enfermedad. Debido a que el grupo AAV *Null* se comporta de igual manera que el grupo EAE, se demuestra que la administración de vectores AAVs no afecta a la progresión de la enfermedad. Así, se decidió utilizar los vectores AAV *Null* como condición control.

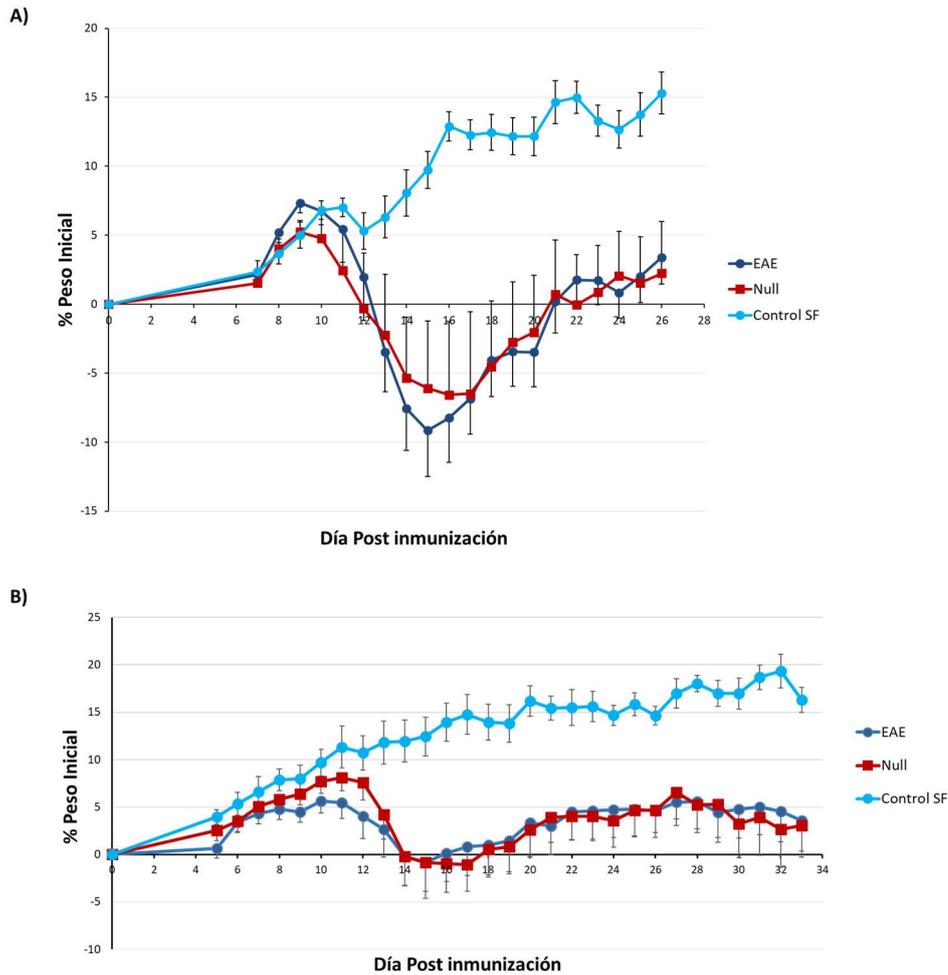


Figura 49. Efecto de la administración intravenosa de un vector viral AAV en el modelo murino de EAE 21 día antes de la inmunización. Seguimiento del peso medio por grupo tras la administración de un vector AAV *Null* a una dosis de 1×10^{11} vg/animal **(A)** ($n=9$) y 5×10^{11} vg/animal **(B)** ($n=14$) respectivamente. En ambos experimentos, se incluyó un grupo control no inmunizado con MOG (control SF; $n=5$). Las barras de errores representan el error estándar.

6.2. Efecto de los vectores portadores de receptores solubles a dosis de 1×10^{11} vg/animal

En trabajos previos en nuestro laboratorio habíamos visto que en el caso de sIL-23R, el efecto terapéutico sobre la evolución clínica de la EAE aparecía a una dosis de 5×10^{11} vg/animal cuando se utilizaba un vector con tropismo hepático (AAV2/8) y que por debajo de esa dosis no se observaba ninguna diferencia respecto al tratamiento control.

Con el objetivo de comprobar de qué manera se comportaban tanto el receptor sIL-7R como la proteína de fusión sIL-23R-sIL-7R, se realizó un experimento con AAV2/9 a una dosis que había resultado ineficiente en el caso del receptor sIL-23R. Así, se administraron los vectores AAV2/9 sIL-7R y AAV2/9 sIL-23R-sIL-7R a una dosis de 1×10^{11} vg/animal por vía intravenosa 21 días antes de la inmunización con MOG. Para la dosis administrada de vectores AAVs, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con AAV sIL-7R o sIL-23R-sIL-7R y el grupo tratado con el vector *Null* (Figura 50). Tampoco se observaron diferencias entre los grupos tratados con los vectores terapéuticos y el vector control respecto al cambio de peso (Figura 51).

En un primer momento, se decidió utilizar el serotipo AAV2/9 debido a su capacidad (aunque muy limitada) de atravesar la BHE y transducir células del SNC para así expresar el transgén también *in situ*. No obstante, al determinar que no era posible la administración post-inmunización, dejó de tener sentido la utilización de un vector con tropismo dual tanto por estructuras sistémicas como para el SNC, de manera que se optó por cambiar el serotipo y, así, aumentar la transducción hepática para incrementar los niveles de receptor soluble circulantes. Debido a ello, en el siguiente experimento se aumentó la dosis 5 veces y se utilizó también el serotipo AAV2/8. Este cambio, además, también habíamos podido comprobar que era beneficioso en el caso de sIL-23R.

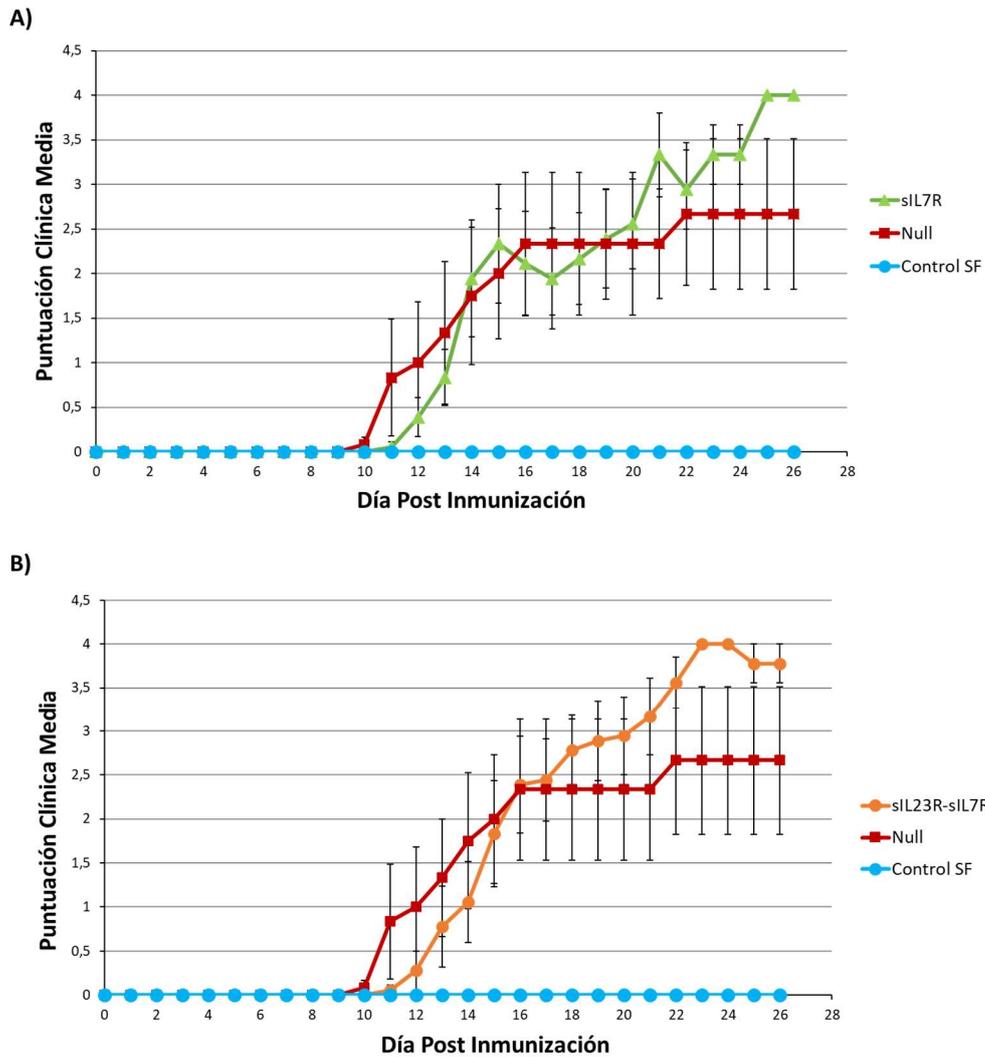


Figura 50. Progreso de la sintomatología clínica del modelo EAE tras la administración intravenosa del vector AAV2/9 CAG sIL-7R **(A)** y AAV2/9 CAG sIL-23R-sIL-7R **(B)** a una dosis de 1×10^{11} vg/animal ($n=9$) 21 días antes de la inmunización. En ambos casos se muestra el grupo control no inmunizado con MOG (control SF; $n=5$). Las barras de error representan el error estándar.

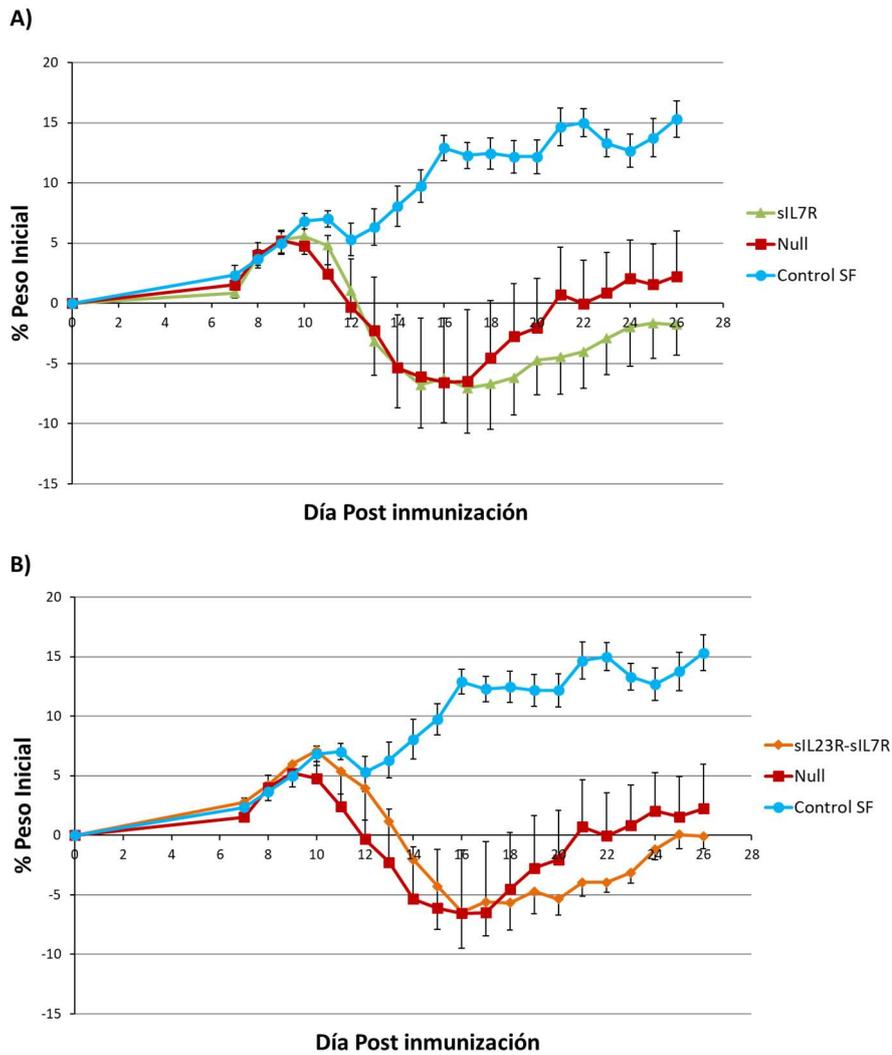


Figura 51. Seguimiento del peso medio por grupo tras la administración de un vector AAV2/9 CAG siL-7R **(A)** y de un vector AAV2/9 CAG siL-23R-siL-7R **(B)** a una dosis de 1×10^{11} vg/animal ($n=9$) respectivamente. En ambos casos se muestra el grupo control no inmunizado con MOG (control SF; $n=5$). Las barras de errores representan el error estándar.

6.3. Efecto de los vectores portadores de receptores solubles a dosis de 5×10^{11} vg/animal

Una vez definido el vector AAV2/8 se decidió realizar un experimento administrando los vectores a dosis de 5×10^{11} vg/animal 21 días antes de la inmunización con MOG. En la figura 52 se muestra la evolución de la

sintomatología clínica de los animales tratados respecto a los animales administrados con el vector *AAV Null*.

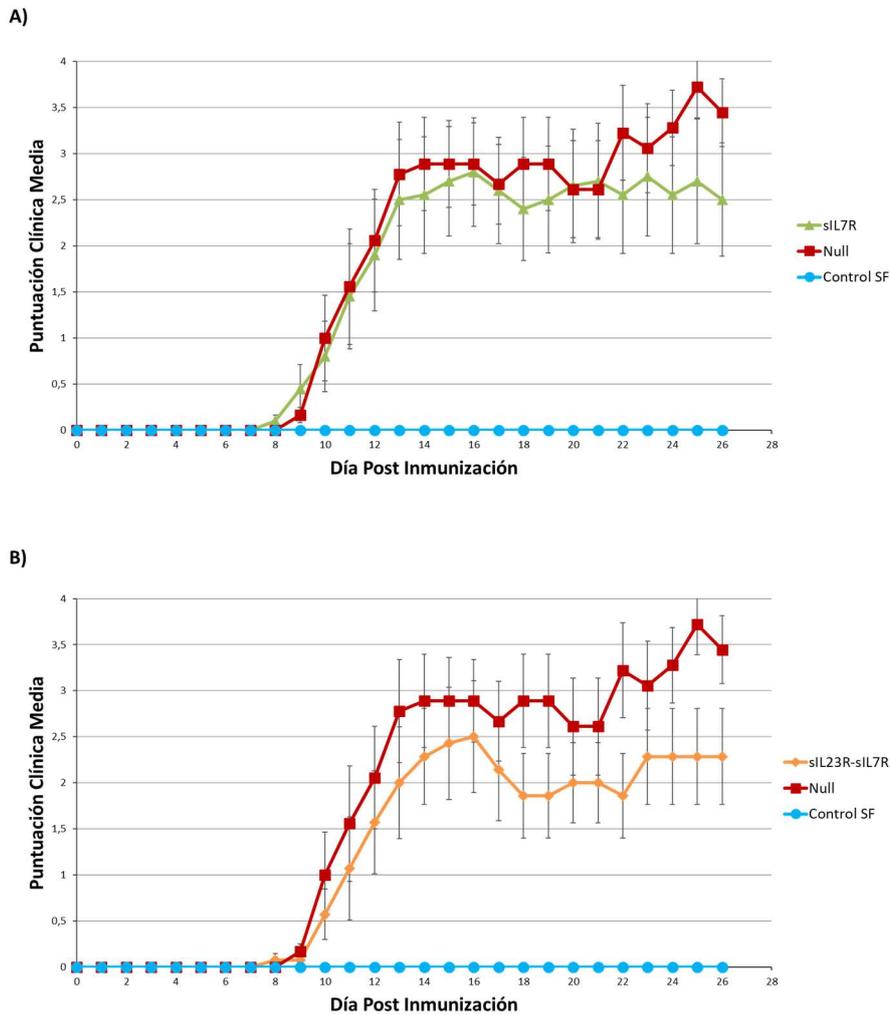


Figura 52. Progreso de la sintomatología clínica del modelo EAE tras la administración intravenosa del vector AAV2/8 CAG sIL-7R (n=10) **(A)** y AAV2/8 CAG sIL-23R-sIL-7R (n=7) **(B)** a una dosis de 5×10^{11} vg/animal 21 días antes de la inmunización. Se incluyó un grupo control no inmunizado con MOG (Control SF; n=5). Las barras de error representan el error estándar.

Se puede observar como en el caso del vector AAV8 sIL-7R, los animales muestran la misma tendencia que los animales administrados con el vector control. Por el contrario, los animales administrados con el vector portador de la proteína de fusión sIL-23R-sIL-7R, muestran una severidad menor. No obstante, a pesar de la

tendencia observada, no se observan diferencias significativas en el área bajo la curva de los diferentes grupos estudiados (figura 53).

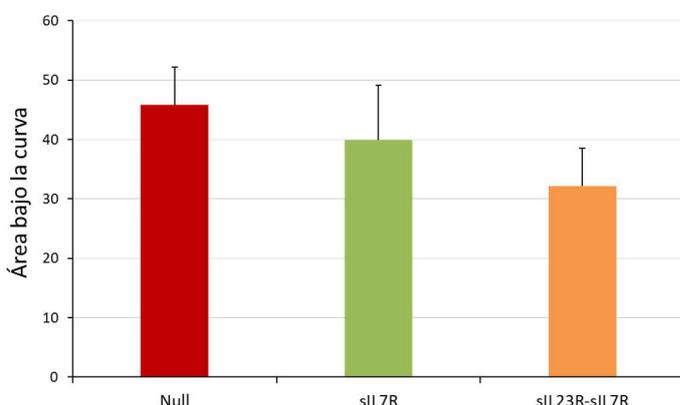


Figura 53. Área bajo la curva del seguimiento clínico del modelo EAE tras la administración intravenosa de los vectores AAV2/8 CMV sIL-7R (n=10) y AAV2/8 CMV sIL-23R-sIL-7R (n=7) a una dosis de 5×10^{11} vg/animal 21 días antes de la inmunización. Las barras de error representan el error estándar.

La misma tendencia se puede observar cuando se analiza la evolución del peso de cada grupo (Figura 54), donde se demuestra que el grupo administrado con el vector portador de la proteína de fusión, muestra un mayor aumento de peso que el grupo administrado con el vector control. Además, el grupo administrado con la proteína de fusión sIL-23R-sIL-7R muestra una puntuación clínica máxima menor, así como una menor puntuación acumulada respecto al grupo control, aunque las diferencias no alcanzan la significancia estadística (Tabla 13).

Tabla 13. Resumen de las variables clínicas del experimento de la administración intravenosa de los vectores AAV2/8 CAG sIL-7R (n=10) y AAV2/8 CAG sIL-23R-sIL-7R (n=7) a una dosis de 5×10^{11} vg/animal en el modelo EAE 21 días antes de la inmunización.

	INCIDENCIA (%)	DÍA INICIO	PUNTUACIÓN CLÍNICA MÁXIMA	PUNTUACIÓN CLÍNICA ACUMULADA
AAV8 Null	100	10,77 ± 1,72	4,06 ± 0,63	47,67 ± 19,75
AAV8 sIL-7R	70	10,00 ± 2,08	3,05 ± 2,01	41,25 ± 30,03
AAV8 sIL23-sIL-7R	85,7	10,33 ± 1,86	2,71 ± 1,47	33,29 ± 17,57

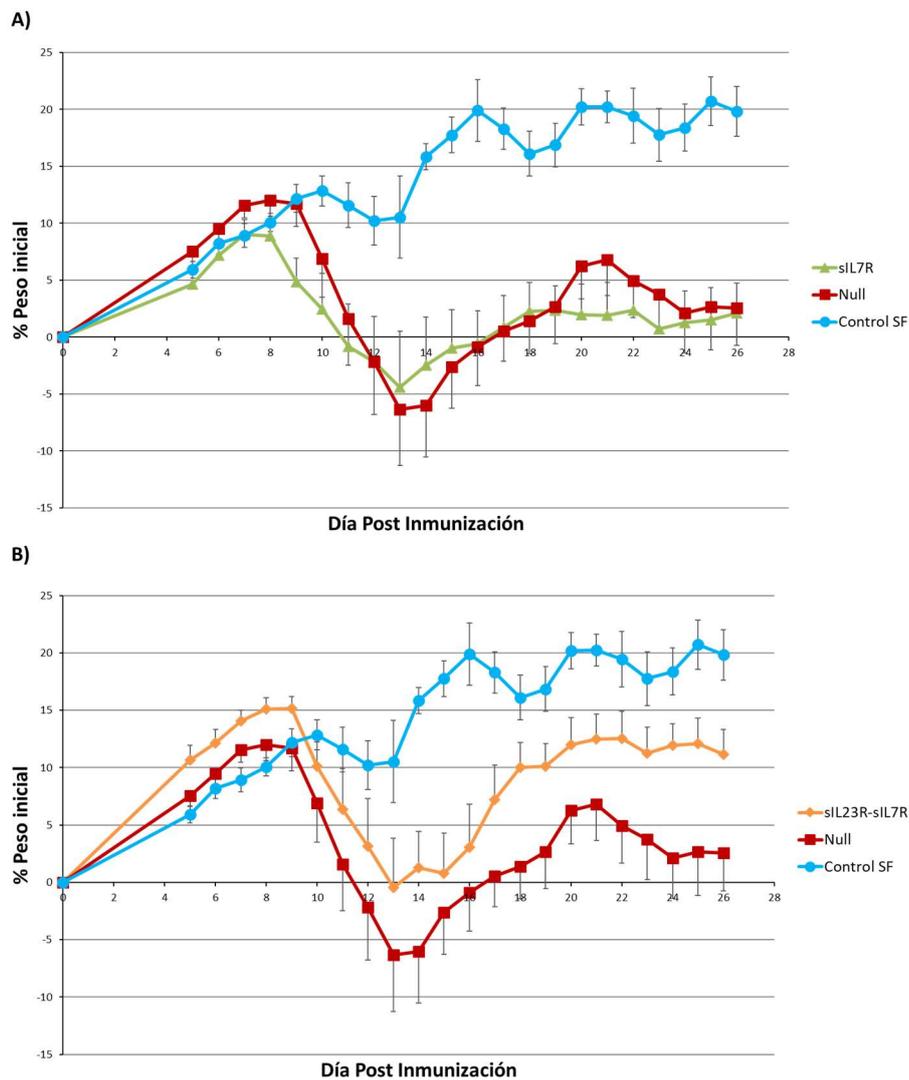


Figura 54. Evolución del peso expresado como porcentaje del peso inicial en animales EAE tras la administración intravenosa de los vectores AA2/8 CAG sIL-7R (n=10) **(A)** y AA2/8 CAG sIL-23R-sIL-7R (n=7) **(B)** a una dosis de 5×10^{11} vg/animal 21 días antes de la inmunización. Se incluyó un grupo control no inmunizado con MOG (Control SF; n=5). Las barras de error representan el error estándar.

Se decidió confirmar el efecto observado al utilizar el vector AAV2/8 sIL-23R-sIL-7R en un segundo experimento independiente. Además, como el constructo con el promotor CAG era ligeramente más grande que el límite de encapsidación de un vector AAV y, por tanto, la productividad era relativamente baja y parte de las

partículas virales podrían ser defectivas, se decidió sustituir el promotor CAG por un promotor CMV que era más corto. Ambos promotores son constitutivos y de expresión fuerte. Por otro lado, se decidió incorporar al experimento animales administrados con los diferentes vectores portadores de los dos receptores solubles por separado para comparar su efecto y estudiar si existían diferencias entre los diferentes tratamientos.

Siguiendo la metodología empleada hasta el momento, 21 días antes de la inmunización con MOG, se administraron animales con cada receptor soluble y se siguió su evolución clínica diaria durante 33 días (n=14 por grupo). En la figura 55 se muestra la evolución clínica de los animales administrados con los receptores solubles AAV2/8 CMV sIL-7R, AAV2/8 CMV sIL-23R y AAV2/8 CMV sIL-23R-sIL-7R. En ella, se puede observar como los dos receptores solubles administrados de manera individual son capaces de reducir la gravedad de la enfermedad y modificar su curso clínico. Del mismo modo, un efecto similar se observa cuando se utiliza la proteína de fusión sIL-23R-sIL-7R. En los tres casos, se observa un día de inicio similar con una cinética parecida. Asimismo, los tres tratamientos detienen la progresión de la enfermedad estabilizándola alrededor de una puntuación clínica cercana a 1,5-2,0 puntos mientras el grupo tratado con el vehículo continúa la progresión de la enfermedad hasta la paraplejia severa o la tetraplejia (puntuación clínica 3/4).

En la figura 56 se muestra el área bajo la curva del seguimiento clínico de los diferentes tratamientos utilizados. Se puede observar como todos los tratamientos reducen la gravedad de la EAE reduciendo el área bajo la curva. Los resultados, a pesar de no ser estadísticamente significativos, muestran una tendencia a la mejora en los tres casos.

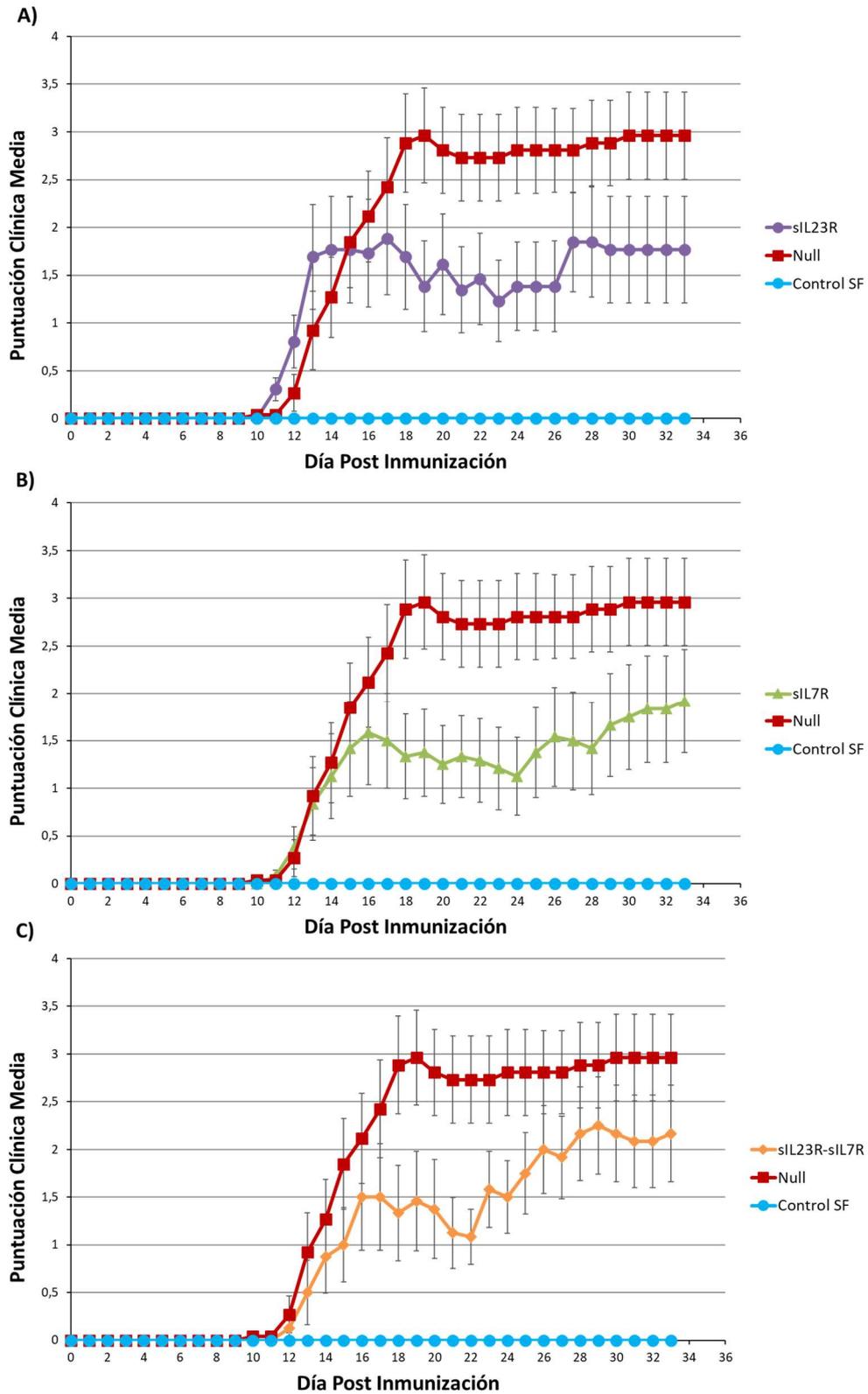


Figura 55. Efecto sobre la evolución clínica del modelo EAE de la administración intravenosa de los vectores AAV2/8 CMV sIL-7R (A), sIL-23R (B) y sIL-23R-sIL-7R (C) a una dosis de 5×10^{11} vg/animal ($n=14$) 21 días antes de la inmunización. Las barras de error representan el error estándar.

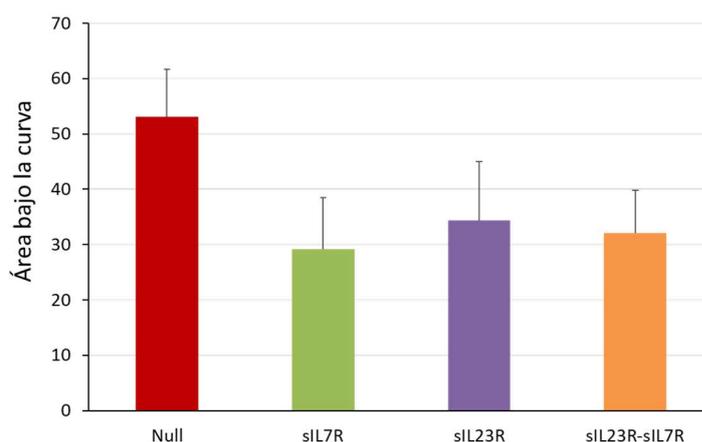


Figura 56. Área bajo la curva del seguimiento clínico del modelo EAE tras la administración intravenosa de los vectores AAV2/8 CMV sIL-7R, AAV2/8 CMV sIL-23R y AAV2/8 CMV sIL-23R-sIL-7R a una dosis de 5×10^{11} vg/animal ($n=14$) 21 días antes de la inmunización. Las barras de error representan el error estándar.

En los tres tratamientos, además, se observa una puntuación máxima más baja, así como una tendencia clara a una puntuación clínica acumulada más reducida (Tabla 14). Los diferentes tratamientos utilizados, parecen afectar a la incidencia de la enfermedad. En todos los grupos, la incidencia fue menor a la observada en el grupo tratado con el vehículo (AAV *Null*). En el caso del tratamiento con AAV2/8 sIL-23R, la reducción de la incidencia al 46% resulta significativa con un valor de significación $p=0,03$. Por otro lado, también se puede observar que la EAE se inicia antes en el caso del tratamiento con AAV2/8 sIL-23R ($p=0,03$).

Tabla 14. Efecto de la administración intravenosa de los diferentes vectores AAV2/8 CMV portadores de los diferentes receptores solubles (sIL-7R, sIL-23R y sIL-23R-sIL-7R) a dosis de 5×10^{11} vg/animal ($n=14$) en el modelo EAE 21 días antes de la inmunización.

	INCIDENCIA (%)	DÍA INICIO	PUNTUACIÓN CLÍNICA MÁXIMA	PUNTUACIÓN CLÍNICA ACUMULADA
AAV8 Null	84,62	$13,82 \pm 2,71$	$3,15 \pm 1,71$	$54,62 \pm 31,56$
AAV8 sIL-7R	58,33	$15,29 \pm 7,89$	$2,04 \pm 2,01$	$30,67 \pm 33,45$
AAV8 sIL-23R	46,15 * $p=0,03$	$11,17 \pm 0,41$ * $p=0,03$	$2,04 \pm 2,05$	$35,38 \pm 39,78$
AAV8 sIL23-sIL-7R	66,67	$16,00 \pm 4,34$	$2,50 \pm 1,88$	$33,54 \pm 29,83$

Los resultados en relación a la progresión de la enfermedad se correlacionan también con la evolución del peso de los animales a lo largo del experimento (Figura 57). En la figura 57 A que muestra la ganancia de peso de los grupos control se puede observar como el grupo sano (control suero fisiológico), va aumentando de peso con el paso de los días siguiendo la cinética esperada. Por el contrario, el grupo tratado con el vehículo muestra una cinética similar a la observada con anterioridad donde comienza a perder peso cuando la enfermedad se empieza a desarrollar y donde empieza a recuperar parte del peso cuando la enfermedad ya está establecida (aproximadamente a partir del día 17 ó 18). Además, se puede observar como los grupos tratados presentan una menor pérdida de peso que el grupo control tratado con AAV *Null*.

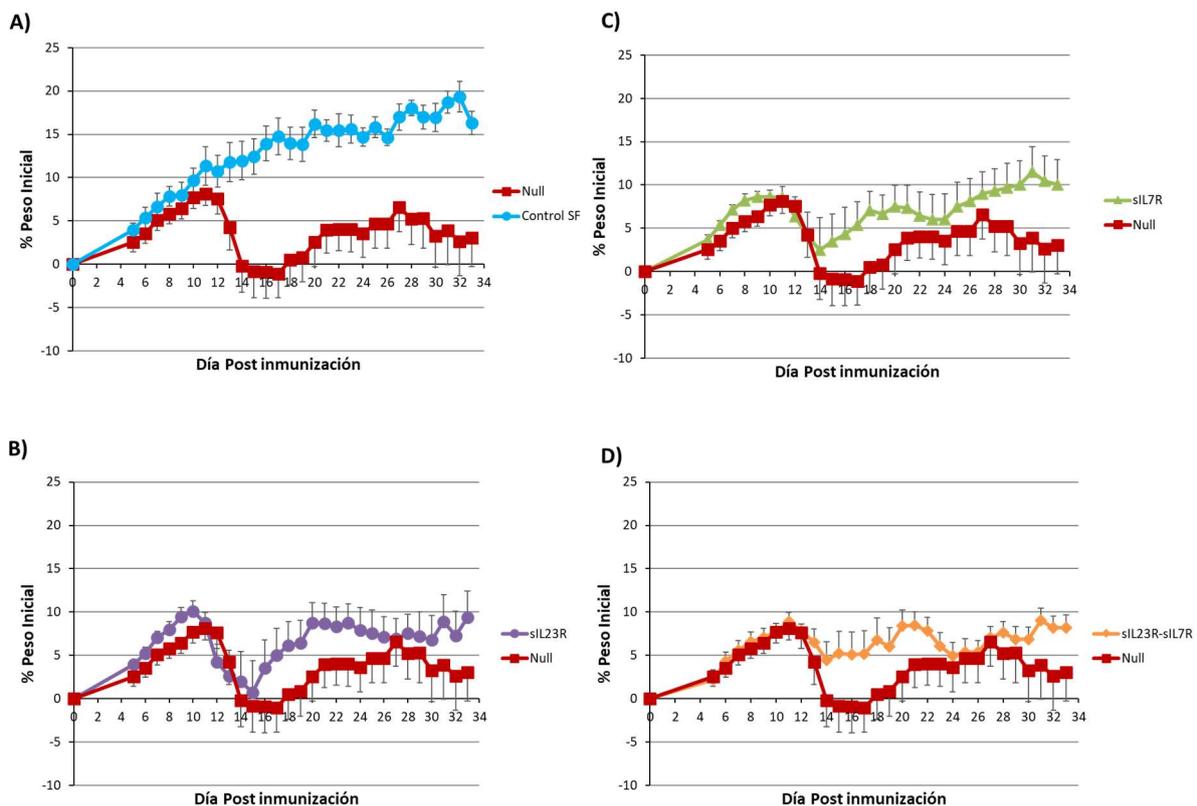


Figura 57. Efecto en el peso de la administración intravenosa de los vectores AAV2/8 CMV *Null* (A), sIL-23R (B), sIL-7R (C) y sIL-23R-sIL-7R (D) a una dosis de 5×10^{11} vg/animal (n=14) en el modelo EAE 21 días antes de la inmunización. Se incluyó un grupo inmunizado con suero fisiológico Control SF; n=5). Evolución del peso expresado como porcentaje del peso inicial.

Debido a que el principal efecto observado en el curso de la enfermedad se produjo sobre la incidencia de la misma, se decidió analizar los animales incidentes por separado para estudiar cómo evolucionaba la enfermedad en ellos. Así, en la figura 58 se muestra la evolución clínica de los diferentes grupos tratados.

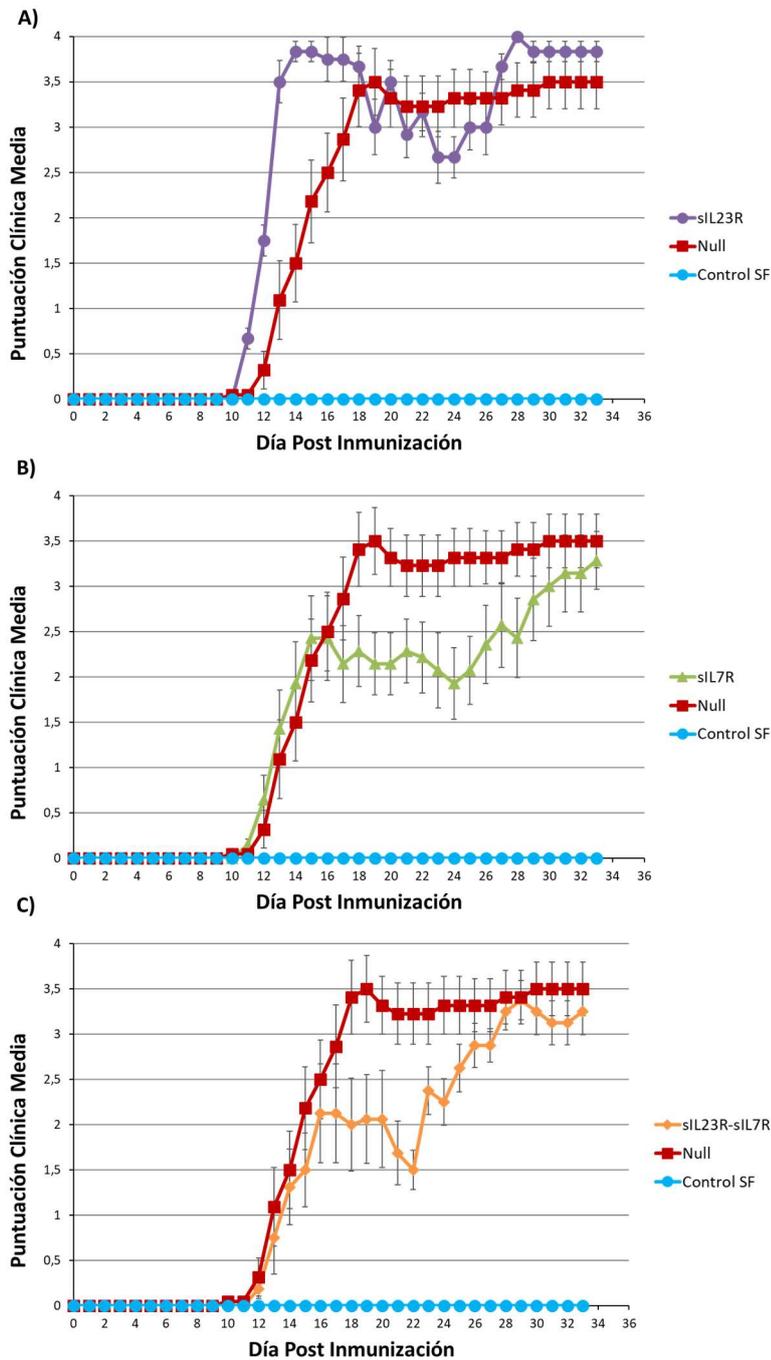


Figura 58. Efecto sobre la evolución clínica del modelo EAE en los animales incidentes de la administración intravenosa de los vectores AAV2/8 CMV siL-7R (A), siL-23R (B) y siL-23R-siL-7R (C) a una dosis de 5×10^{11} vg/animal ($n=14$) 21 días antes de la inmunización. Las barras de error representan el error estándar.

En este caso, se puede observar como el grupo administrado con el vector AAV2/8 CMV sIL-23R muestra un perfil muy similar al grupo administrado con el vector control. Por el contrario, los grupos administrados con los vectores AAV2/8 CMV sIL-7R y AAV2/8 CMV sIL-23R-sIL-7R muestran, ambos, un perfil de gravedad menor alcanzando la significancia estadística en el caso del grupo tratado con la proteína de fusión (Figura 59). Un efecto similar se observa al analizar tanto la puntuación clínica máxima como la puntuación clínica acumulada (Tabla 15)

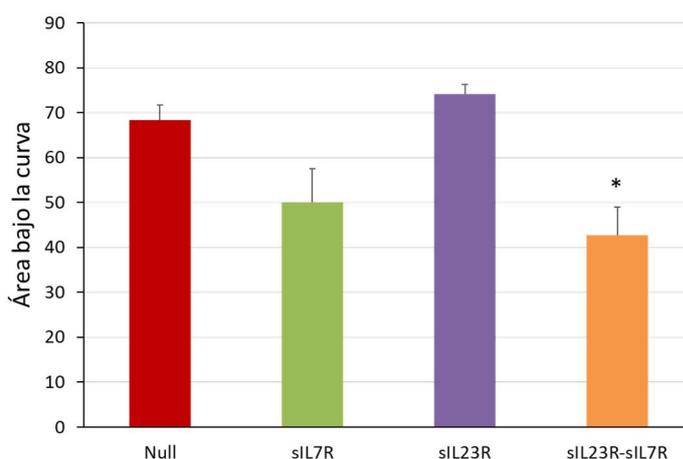


Figura 59. Área bajo la curva del seguimiento clínico de los animales incidentes del modelo EAE tras la administración intravenosa de los vectores AAV2/8 CMV sIL-7R, AAV2/8 CMV sIL-23R y AAV2/8 CMV sIL-23R-sIL-7R a una dosis de 5×10^{11} vg/animal (n=14) 21 días antes de la inmunización. Las barras de error representan el error estándar.

Tabla 15. Efecto en los animales incidentes de la administración intravenosa de los diferentes vectores AAV2/8 CMV portadores de los diferentes receptores solubles (sIL-7R, sIL-23R y sIL-23R-sIL-7R) a dosis de 5×10^{11} vg/animal (n=14) en el modelo EAE 21 días antes de la inmunización.

	PUNTUACIÓN CLÍNICA MÁXIMA INCIDENTES	PUNTUACIÓN CLÍNICA ACUMULADA INCIDENTES
AAV8 Null	3,73 ± 1,08	64,55 ± 22,14
AAV8 sIL-7R	3,06 ± 1,66	51,07 ± 26,46
AAV8 sIL-23R	4,08 ± 0,20	76,00 ± 8,20
AAV8 sIL23-sIL-7R	3,63 ± 0,74	49,69 ± 16,18 *p=0,03

Posteriormente, se realizaron cortes histológicos de la médula espinal de seis animales representativos de cada grupo teniendo en cuenta la puntuación clínica acumulada para analizar la infiltración inflamatoria mediante las tinciones de hematoxilina-eosina y Klüver-Barrera (Figura 60).

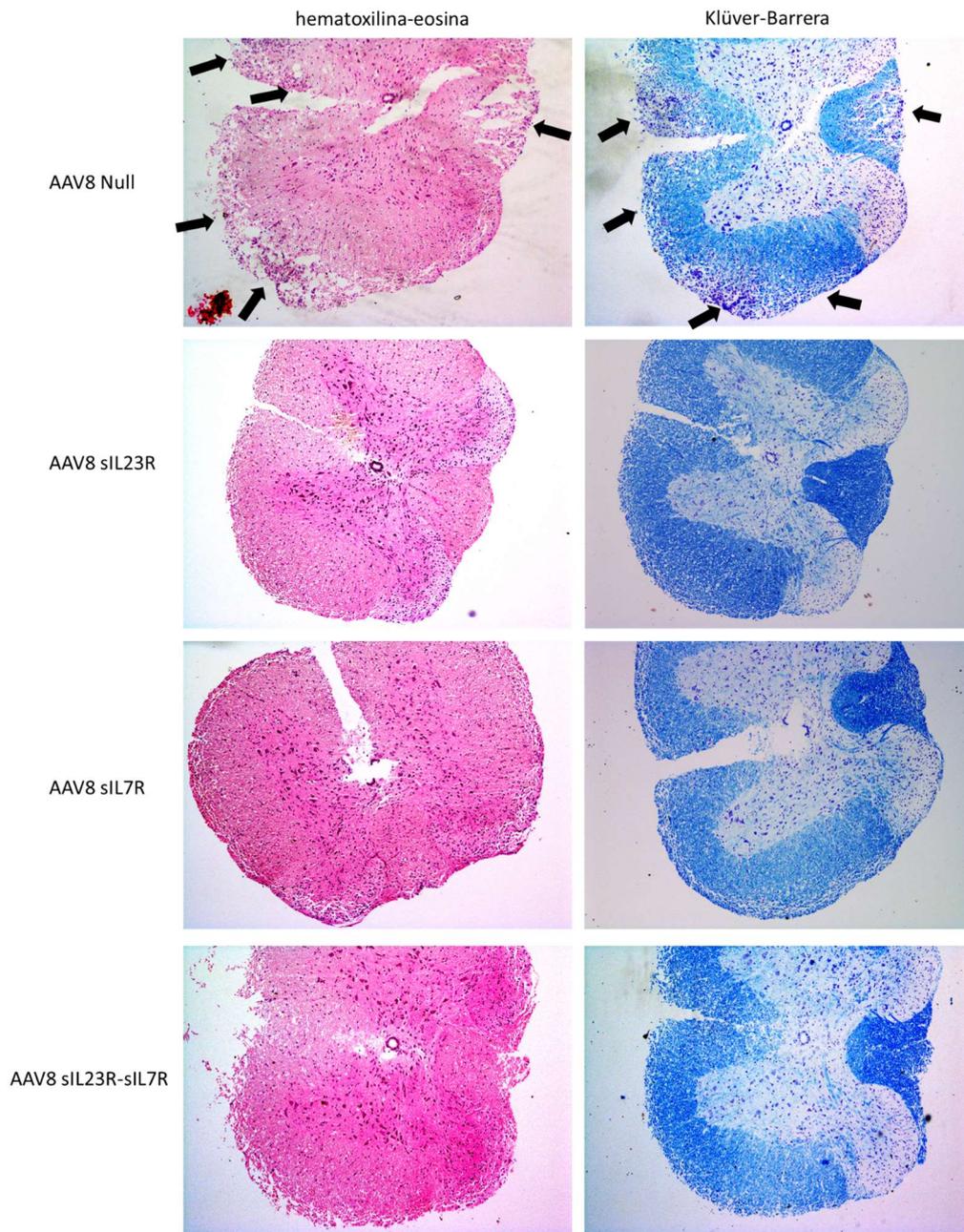


Figura 60. Cortes histológicos de médula espinal teñidos con hematoxilina-eosina (HE) y Klüver-Barrera (KB) de ratones EAE administrados con los vectores AAV2/8 CMV Null, AAV2/8 CMV sIL-23R, AAV2/8 CMV sIL-7R y AAV2/8 CMV sIL-23R-sIL-7R a una dosis de 5×10^{11} vg/animal 21 días antes de la inmunización. Las flechas indican infiltrados inflamatorios (HE) y áreas de desmielinización (KB).

En todos los casos, se puede observar una tendencia (sin diferencias estadísticamente significativas) a un menor grado de inflamación como muestran las tinciones con hematoxilina-eosina y Klüver-Barrera, cuando se compara con los animales administrados con el vector AAV8 *Null* (Figura 61).

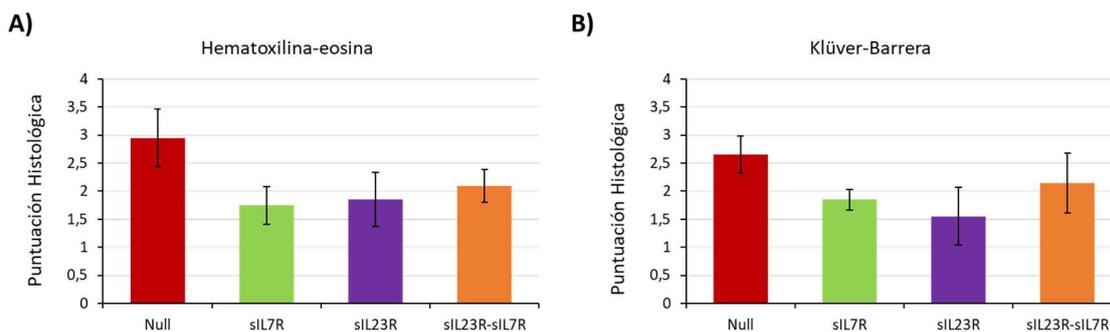


Figura 61. Análisis histopatológico de cortes de médula espinal (n=6/grupo) teñidos con hematoxilina-eosina **(A)** y Klüver-Barrera **(B)** de ratones EAE administrados con los vectores AAV2/8 CMV *Null*, AAV2/8 CMV siL-23R, AAV2/8 CMV siL-7R y AAV2/8 CMV siL-23R-siL-7R a una dosis de 5×10^{11} vg/animal 21 días antes de la inmunización. Las barras de error representan el error estándar.

Para estudiar la respuesta proliferativa antígeno específica (MOG) y policlonal (PHA) de los linfocitos se preparó un cultivo de esplenocitos de los ratones administrados por vía intravenosa 21 días antes de la inmunización (n=6). Por un lado, los diferentes cultivos fueron expuestos a un mitógeno inespecífico (PHA) que activa todos los linfocitos y a MOG para inducir la proliferación de aquellos linfocitos específicos para ese antígeno y se cuantificó la actividad proliferativa midiendo la incorporación de timidina tritiada. La figura 62 muestra la proliferación de los diferentes cultivos y permite observar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos indicando que los diferentes tratamientos no modifican la capacidad proliferativa policlonal ni la de los linfocitos autoreactivos.

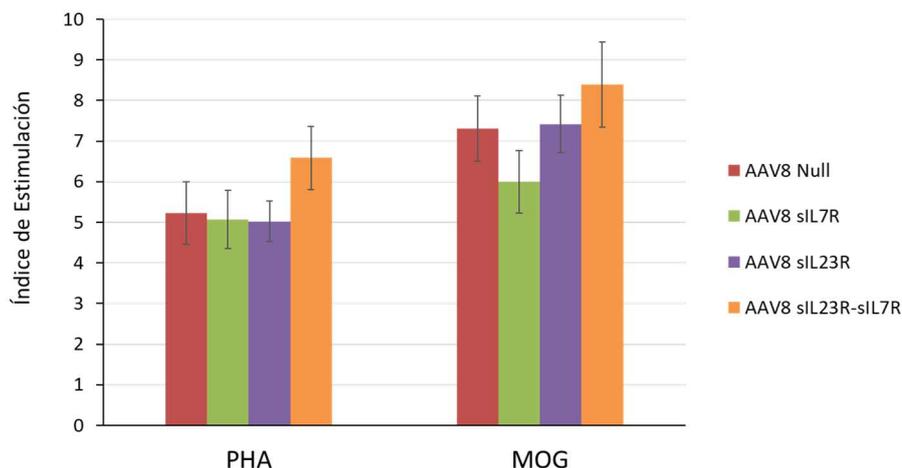


Figura 62. Respuesta proliferativa inespecífica (PHA) y antígeno-específica (MOG) de cultivos de esplenocitos de bazo de ratones EAE administrados con diferentes vectores AAVs por vía intravenosa a día -21 (n=6/grupo). Las barras de error representan el error estándar.

Para comprobar la presencia de genomas virales y la expresión del transgén se realizó una extracción de DNA genómico de los hígados mediante el método de *Hirt* para evaluar la presencia de los vectores en el tejido diana.

En la figura 63 A se muestra cuantificación de genomas portadores del gen sIL-7R en los diferentes grupos. Los *primers* para el gen sIL-7R reconocen la parte final del gen de manera que son capaces de amplificar tanto el gen sIL-7R como el gen sIL-23R-sIL-7R. Se observa una gran amplificación en ambos grupos con niveles de 73,33 y 144,31 (Tabla 16) veces más genomas que en el grupo *Null* ($p < 0.001$). Además, aparecen cuatro veces más genomas en el grupo tratado con AAV2/8 sIL-23R respecto el control, probablemente debido a una pequeña contaminación. La cuantificación de genomas portadores de la secuencia sIL-23R (Figura 63 B) detecta únicamente transducción hepática en el grupo tratado con AAV2/8 sIL-23R. En este caso, los *primers* para el gen sIL-23R reconocen la región final del gen que incluye la región *stop*. Esta pequeña región no se encuentra en la proteína de fusión sIL-23R-sIL-7R debido a que se eliminó para hacer coincidir el marco de lectura con la secuencia de sIL-7R de manera que la pareja de *primers* que amplifica el gen sIL-23R no lo hace en la proteína dual. Por último, en la figura 63 C, se

muestra la cuantificación de genomas portadores de la secuencia sIL-23R-sIL-7R en los tres grupos tratados. En este caso, se detectan genomas únicamente en el grupo tratado con el vector AAV2/8 sIL-23R-sIL-7R.

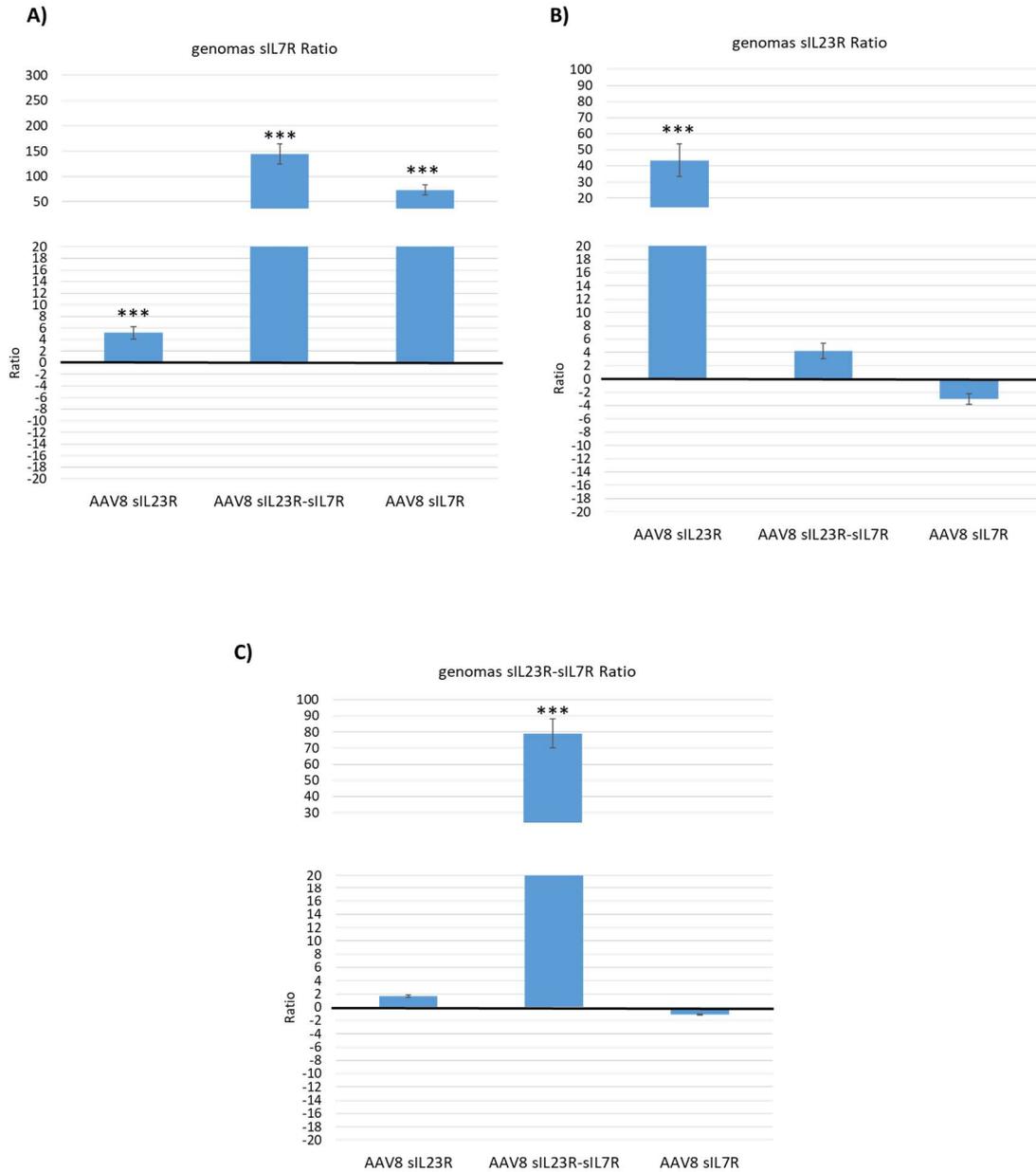


Figura 63. Cuantificación por qPCR de los genomas virales en muestras de hígado de animales EAE administrados con diferentes vectores AAVs a día -21 post-inmunización de los genes sIL-7R **(A)**, sIL-23R **(B)** y sIL-23R-sIL-7R **(C)** en comparación con el grupo tratado con vector AAV8 *Null*. Las barras de error representan el error estándar.

Tabla 16. Cuantificación por qPCR de los genomas virales en muestras de hígado de animales EAE administrados con diferentes vectores AAVs a día -21 post-inmunización.

		RATIOS COMPARADOS CON AAV8 NULL			
		AAV8 Null	AAV8 sIL23R	AAV8 sIL23R-sIL7R	AAV8 sIL7R
Genomas sIL7R	Ratio genomas respecto Null	1	5,2	144,31	73,33
	Error estándar	0,09	1,07	19,81	9,81
	Significación		<0,001	<0,001	<0,001
Genomas sIL23R	Ratio genomas respecto Null	1	43,41	4,21	-3,03
	Error estándar	0,32	10,13	1,18	0,81
	Significación		<0,001	ns	ns
Genomas sIL23R-sIL7R	Ratio genomas respecto Null	1	1,67	79,07	-1,08
	Error estándar	0,04	0,17	9,05	0,1
	Significación		ns	<0,001	ns

(ns: no significativo)

Se puede deducir, por tanto, que los vectores administrados vía intravenosa 21 días antes de la inducción de la EAE permanecen dentro de las células una vez se establece la enfermedad y no son eliminados por el sistema inmunológico una vez éste se activa. Tras demostrar la presencia de genomas virales en las células diana, se estudió la expresión de los transgenes en los animales tratados. En la figura 64 se muestra la cuantificación por PCR cuantitativa de la expresión de los diferentes transgenes en todos los grupos tratados comparando su expresión con los niveles observados en los animales control (AAV2/8 *Null*). Se puede observar como en todos los casos, los vectores son capaces de expresar sus transgenes correspondientes ($p < 0.001$). En el caso de los animales tratados con el vector AAV2/8 sIL-23R, la pequeña contaminación de genomas virales portadores de la secuencia sIL-7R, se traduce también con expresión del mismo gen. En este caso, la diferencia de expresión respecto a los animales tratados con el vector AAV2/8 *Null* (17,77 veces mayor) resulta también significativa. No obstante, no alcanza los niveles de expresión de los genes correspondientes que alcanzan los animales tratados con sIL-7R (677,15 veces superior al control) o sIL-23R-sIL-7R (220,53 veces mayor que el control) (Tabla 17).

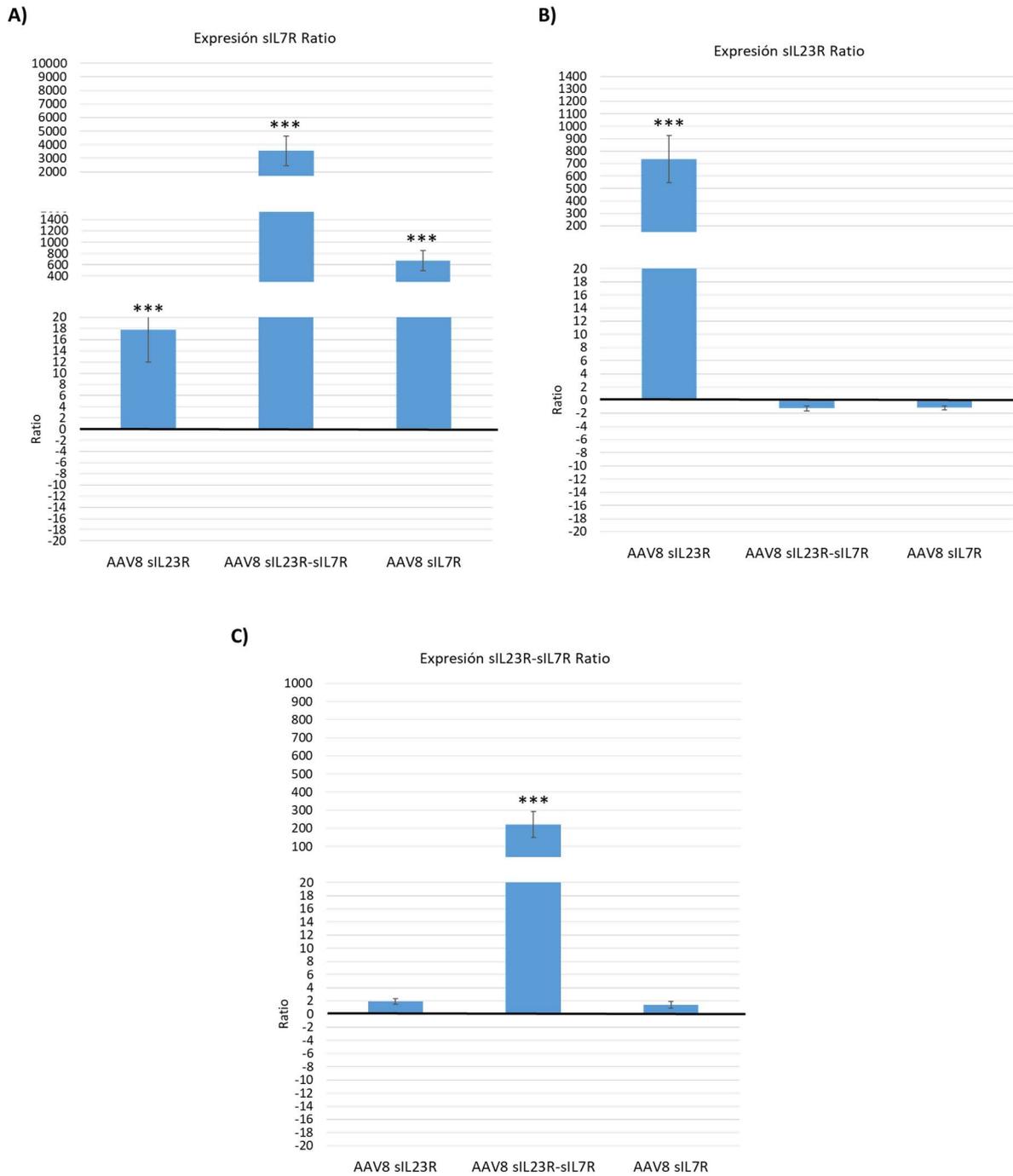


Figura 64. Cuantificación por qPCR de los diferentes mRNAs en muestras de hígado de animales EAE administrados con diferentes vectores AAV a día -21 post-inmunización de los genes sIL-7R **(A)**, sIL-23R **(B)** y sIL-23R-sIL-7R **(C)** en comparación con el grupo tratado con vector AAV8 *Null*. Las barras de error representan el error estándar.

Tabla 17. Cuantificación por qPCR de los niveles de mRNA de los diferentes genes en muestras de hígado de animales EAE administrados con diferentes vectores AAV a día -21 post-inmunización.

		RATIOS COMPARADOS CON AAV8 NULL			
		AAV8 Null	AAV8 sIL23R	AAV8 sIL23R-sIL7R	AAV8 sIL7R
Expresión sIL7R	Ratio respecto Null	1	17,77	3540,12	677,15
	Error estándar	0,34	5,8	1107,17	179,57
	Significación		<0,001	<0,001	<0,001
Expresión sIL23R	Ratio respecto Null	1	736,39	-1,25	-1,15
	Error estándar	0,35	189,77	0,36	0,29
	Significación		<0,001	ns	ns
Expresión sIL23R-sIL7R	Ratio respecto Null	1	1,92	220,53	1,41
	Error estándar	0,29	0,44	71,48	0,48
	Significación		ns	<0,001	ns

(ns: no significativo)

DISCUSIÓN

El sistema inmune se encarga de defender al organismo de una gran cantidad de patógenos como bacterias, virus, hongos o parásitos, que se encuentran en constante evolución. Con ese objetivo, las células inmunes poseen un repertorio de receptores de antígeno casi ilimitado generados por procesos aleatorios para reconocer dichos antígenos y eliminarlos. La evolución ha dotado a los organismos superiores de la capacidad de adaptación a nuevos antígenos que suponen una amenaza vital gracias a múltiples mecanismos. Quizás el más importante es la generación de receptores de células T y B de manera aleatoria gracias a mecanismos como el reordenamiento génico entre otros. Estos mecanismos que generan receptores de manera aleatoria deben estar finamente regulados para evitar la generación de células autoreactivas. Así pues, con la evolución del sistema inmune hacia un sistema altamente complejo, se ha generado un mecanismo que permite al sistema inmune no reaccionar ante lo propio. En circunstancias normales, las células que reconocen elementos propios son eliminadas una vez se generan mediante los mecanismos de selección y no acaban formando parte del repertorio del individuo. No obstante, en algunas circunstancias, los mecanismos de tolerancia central fallan y estas células que escapan del control, pasan a la periferia del organismo dando lugar a células autoreactivas. En estos casos, se pueden convertir en un peligro para la salud del individuo ya que pueden dar lugar a desórdenes autoinmunes.

Durante años estuvo vigente la hipótesis de que las células Th1 eran las responsables de la autoinmunidad. No obstante, diversos estudios demostraron que los animales carentes de esta vía eran susceptibles a este tipo de enfermedades. Además, los estudios en el modelo de EAE donde se administraban anticuerpos anti-IFN- γ , de forma que se inhibía la respuesta Th1 y, por tanto, se hipotetizaba una mejoraría del pronóstico, demostraron que se producía un empeoramiento de la enfermedad (Billiau et al., 1988). Por otro lado, se demostró que la administración de IFN- γ inhibía el desarrollo de la EAE (Voorthuis et al., 1990). Finalmente, tras el descubrimiento de las células Th17, se evidenció el papel principal de este nuevo linaje celular en el desarrollo de la autoinmunidad.

A medida que se iban realizando estudios, se fueron atribuyendo nuevas funciones a las citoquinas conocidas y se fueron descubriendo nuevas citoquinas que jugaban papeles sobre las células Th17 como la IL-21 (He et al., 2012) o la IL-23 (Langrish et al., 2005). Paralelamente, los estudios genéticos poblacionales fueron demostrando correlaciones entre diferentes variantes de genes con enfermedades autoinmunes (Wang et al., 2015). La convergencia de todos estos estudios ha proporcionado a la comunidad científica una idea del papel que juegan múltiples factores sobre la patogenia de las enfermedades autoinmunes y ha proporcionado nuevas estrategias terapéuticas capaces de intervenir en el desarrollo de las células Th17 para controlar dichas enfermedades.

Concretamente, la IL-23 es una citoquina central en el desarrollo y mantenimiento de las células Th17 de manera que el bloqueo de la interacción con su receptor ha sido estudiado como diana terapéutica para múltiples enfermedades autoinmunes incluida la EM. En 2012, se publicó un estudio donde se generaba un receptor soluble de IL-23 capaz de interactuar y bloquear la actividad de IL-23 (Guo et al., 2012). Posteriormente, el mismo grupo demostró una reducción de la severidad de la EAE administrando el receptor soluble de IL-23 seis días después del inicio de la sintomatología clínica (Guo et al., 2014). En ambos casos, se utilizó la secuencia del receptor humano de IL-23 para generar el receptor soluble. En estudios previos de nuestro grupo, se generó un receptor con la secuencia murina y se demostró que también era capaz de mejorar clínica e histopatológicamente la EAE (Miralles et al., 2017).

Otra citoquina relevante en la patogenia de las enfermedades autoinmunes es la IL-7. Múltiples estudios han demostrado la implicación del eje IL-7/IL-7R en la EM (Kreft et al., 2012), el síndrome de Sjögren (Jin et al., 2013), las enfermedades inflamatorias intestinales (Ji et al., 2015), la espondilitis anquilosante (Gracey et al., 2016) o la artritis reumatoide (Pathak, 2014). Además, el bloqueo de esta vía mediante anticuerpos neutralizantes ha demostrado mejoras en diferentes modelos animales de enfermedades autoinmunes. Así, la administración de anticuerpos anti-IL-7R fue capaz de reducir la severidad de la EAE, reduciendo tanto la sintomatología clínica como la infiltración en el SNC (Lee et al., 2011). De

igual forma, el tratamiento con anticuerpos anti-IL7R también inhibió el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 1 en ratones NOD, ya que impedía la generación de células T autoreactivas, evitando así la infiltración y la destrucción de los islotes pancreáticos (Penaranda et al., 2012).

Gracias a todos los estudios anteriores, se considera que las células Th1 y Th17 juegan un papel central en la patogenia tanto de la EAE como de la EM (Fletcher et al., 2010). Mientras que la IL-23 es esencial para la generación de las células T CD4+ implicadas en la inducción de la EAE (McGeachy et al., 2009), la IL-7 se relaciona con la generación de células T (Peschon et al., 1994) y con el mantenimiento y supervivencia de las células T de memoria en la periferia (Bielekova et al., 1999). A pesar de que ambas citoquinas han sido altamente estudiadas en el desarrollo de la EM, existen muy pocos estudios que investiguen la posible relación entre ambas en la generación de células Th17 autoreactivas y todavía menos que utilicen terapias centradas en el bloqueo de la señalización de ambas citoquinas.

1. GENERACIÓN DE RECEPTORES SOLUBLES PARA EL BLOQUEO DE CITOQUINAS

En este trabajo, se han utilizado receptores solubles para la IL-23 y la IL-7, con el objetivo de bloquear la señalización de sus respectivos ligandos. En el caso de la IL-7, se ha utilizado la forma murina soluble natural descrita en 1990 y reportada en múltiples trabajos hasta la fecha (Goodwin et al., 1990). Por otro lado, también se ha utilizado una forma murina del receptor soluble de IL-23 generada de forma sintética emulando la forma soluble humana descrita por Zhang y colaboradores (Zhang et al., 2006).

En los últimos años, se han llevado a cabo numerosos ensayos clínicos utilizando anticuerpos capaces de neutralizar diferentes moléculas implicadas en el desarrollo de células Th17 (Constantinescu et al., 1998), en su mantenimiento (Wiendl & Gross, 2013) o en su capacidad migratoria (Yednock et al., 1992). A

pesar de que en algunas enfermedades autoinmunes han tenido algún resultado relevante, en el caso de la EM no se han conseguido datos especialmente alentadores. Además, se ha demostrado que la administración continuada de anticuerpos es capaz de generar anticuerpos anti-idiotipo que reducen la capacidad de la terapia (Calabresi et al., 2007). Para evitar este problema, se han utilizado estrategias basadas en la administración de receptores solubles que bloquean la unión del ligando a su receptor de membrana. Actualmente se conocen multitud de formas solubles para diferentes receptores celulares. Éstos, pueden ser generados como resultado de la proteólisis del mismo receptor transmembrana o como consecuencia de un *splicing* alternativo. En ambos casos, se obtiene una forma que contiene principalmente la región extracelular del receptor nativo y se encuentra de forma libre en el espacio extracelular. En el caso de los receptores de citoquinas, se han descubierto también diversos receptores solubles. A pesar de que la función de la mayoría es aún desconocida, se ha hipotetizado mucho, en los últimos años, sobre sus posibles funciones. En el caso del receptor de la IL-1, la forma soluble es capaz de secuestrar la IL-1 circulante reduciendo su señalización (Giri et al., 1994). Por el contrario, el receptor soluble de la IL-6 es capaz de facilitar el acceso a su receptor aumentando su actividad (Peters et al., 1996).

La posible función de un receptor soluble depende de múltiples factores. Hay que tener en cuenta que la señalización se produce únicamente a través de la interacción entre la citoquina y su receptor transmembrana, de manera que los receptores solubles intervienen facilitando o inhibiendo esa interacción. Los receptores solubles, del mismo modo que sus formas transmembrana, poseen una afinidad determinada por su citoquina correspondiente, y, por tanto, la unión de una citoquina con un receptor soluble o con su forma transmembrana dependerá de cómo sea la afinidad por cada uno de ellos y de su concentración relativa. Así pues, se genera un sistema complejo donde los organismos regulan la señalización mediante diferentes mecanismos. En primer lugar, pueden activar o inhibir la síntesis de una citoquina, de un receptor transmembrana o de un receptor soluble. Pueden modificar la afinidad de las diferentes moléculas a través de

modificaciones post-traduccionales haciendo más favorable la unión a unas formas respecto a otras; o pueden modificar la proporción relativa de las tres moléculas aumentando las probabilidades de interacción entre una pareja respecto a la otra. El resultado, en cada momento, será el aumento o la disminución de la señalización a través del receptor transmembrana.

Uno de los factores genéticos asociados con la EM más estudiados en los últimos años es el SNP rs6897932 [C] del gen IL-7R α . Los portadores del alelo "C" en esta región poseen mayor riesgo de padecer EM que los portadores del alelo "T". Este polimorfismo se encuentra en una zona que afecta al *splicing* alternativo del receptor produciendo una forma sin el exón 6 (región transmembrana) aumentando los niveles de receptor soluble. Además, este polimorfismo se acompaña de niveles elevados de IL-7 en el plasma de pacientes con EM (Lundstrom et al., 2013). En relación a las funciones fisiológicas del sIL-7R existe gran controversia. Mientras que en un estudio se demuestra que la unión entre el receptor soluble y su citoquina bloquea la actividad de ésta inhibiendo su señalización (Crawley et al., 2010), otros estudios demuestran que el sIL-7R aumenta la bioactividad de IL-7 aumentando su señalización (Cote et al., 2015; Lundstrom et al., 2013). En la mayoría de casos, las posibles funciones se demuestran mediante ensayos *in vitro* sobre cultivos celulares o a través de pruebas indirectas midiendo niveles en plasma de pacientes.

Debido a la idea de que el efecto producido debería ir en función de la concentración de las diferentes citoquinas en plasma y de sus correspondientes receptores solubles, así como de los niveles de receptor en membrana, hipotetizamos que, a pesar de que a ciertas concentraciones pueda actuar como un estabilizador de la vida media en plasma, niveles muy altos de receptor soluble deberían producir un bloqueo de su actividad. Así pues, la utilización de vectores de terapia génica con promotores ubicuos debería generar un exceso de receptor soluble que bloquearía la capacidad de unión de las citoquinas a sus receptores de membrana.

En el presente estudio no hemos sido capaces de reproducir los resultados que demuestran que el sIL-7R es capaz de reducir la señalización a través del receptor de membrana demostrados previamente donde se describe que el sIL-7R inhibe la señalización de la IL-7 a corto plazo, aunque finalmente se concluye que el sIL-7R es capaz de potenciar la actividad de la IL-7 a largo plazo en pacientes con EM (Lundstrom et al., 2013). No obstante, el efecto de potenciación de la actividad de la IL-7 lo observaron únicamente en estudios *in vitro*, a una relación molar concreta entre el sIL-7R y la IL-7 (entre 256-512:1) mientras que para relaciones molares superiores (mayores a 1024:1) observaron una reducción de la señalización de la IL-7. El hecho de que a relaciones molares elevadas entre el sIL-7R y la IL-7 se reduzca la señalización a través del receptor de membrana apoya nuestra hipótesis, basada en la utilización de vectores de terapia génica capaces de sobreexpresar diferentes receptores solubles en concentraciones elevadas para inhibir de la acción de sus ligandos.

Durante la realización de este trabajo se ha desarrollado un método funcional para la demostración del efecto de los receptores solubles sobre la señalización a través de los correspondientes receptores transmembrana. Muchos de los ensayos funcionales de bloqueo de citoquinas se realizan con líneas estables dependientes de alguna citoquina. Estas líneas celulares generalmente requieren de dicha citoquina para su supervivencia de manera que el bloqueo de éstas afecta a la viabilidad celular. Actualmente existen diversos ejemplos de líneas dependientes de citoquinas como por ejemplo la línea DS-1 humana dependiente de IL-6 (Bock et al., 1993), la línea FDC-P1 murina dependiente de IL-3 (Dexter et al., 1980) o la línea 2E8 murina dependiente de IL-7 (Pietrangeli et al., 1988). El problema de estas líneas celulares es que su mantenimiento en cultivo resulta muy costoso ya que el medio de cultivo requiere estar suplementado con la citoquina en cuestión. Además, no existen líneas dependientes para todas las citoquinas. De hecho, actualmente no existe ninguna línea descrita dependiente de IL-23. La metodología propuesta en este trabajo se basa en realizar un cultivo primario de esplenocitos murinos en suspensión. Este tipo de cultivos, a pesar de perder viabilidad rápidamente, están formados, principalmente, por linfocitos que poseen los

diferentes receptores de citoquinas en el momento permitiendo la realización de ensayos funcionales. En concreto, los esplenocitos murinos poseen receptores de IL-23 y que son capaces de responder a la unión de la misma mediante la fosforilación de STAT3. De esta forma hemos demostrado que el sIL-23R murino generado es capaz de bloquear la fosforilación de STAT3 *in vitro*, indicando que inhibe la señalización a través de su receptor de membrana y confirmando así los resultados previos de Guo et al. realizados con el receptor sIL-23R humano (Guo et al., 2014). Esta metodología podría tener una ventaja terapéutica relevante sobre la utilización de anticuerpos, ya que la producción endógena del receptor soluble no induciría la producción de anticuerpos contra la molécula terapéutica, como sucede cuando se utilizan anticuerpos, y evitaría así que la eficacia del tratamiento se viera mermada.

2. GENERACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN sIL-23R-sIL-7R PARA EL BLOQUEO DE CITOQUINAS

Debido a la clara implicación tanto de la IL-23 como de la IL-7 en la EM y su patogenia, en este trabajo se decidió generar un receptor soluble capaz de bloquear ambas citoquinas simultáneamente. Para ello, se generó una molécula dual compuesta por ambos receptores solubles unidos por una secuencia *linker* que facilitaba el plegamiento independiente de los dos dominios. Así, se decidió utilizar la secuencia (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n conocida como *Flexible Linker* por tratarse de una de las más utilizadas capaces de garantizar la funcionalidad de las proteínas unidas (Argos, 1990). Este tipo de secuencias flexibles, están formadas por aminoácidos pequeños que permiten la funcionalidad y la movilidad de los diferentes dominios para permitir el plegamiento.

Uno de los posibles problemas de la generación de nuestra proteína de fusión podría haber sido la fragilidad de la unión y su posible rotura. A pesar de no haber probado diferentes *linkers*, se consideró la utilización de la secuencia (Gly₄Ser)₂

debido a tratarse de una región flexible que no posee demasiadas secuencias repetidas que pudiesen comportar la recombinación homóloga de su secuencia.

Gracias a la tecnología del DNA recombinante, la generación de proteínas de fusión ha supuesto un gran avance en el desarrollo de nuevas moléculas terapéuticas. Además de las grandes implicaciones en investigación debido a sus aplicaciones para la purificación de proteínas (Terpe, 2003) o la microscopía de fluorescencia (Yuste, 2005), en la actualidad supone un campo muy atractivo a nivel farmacológico ya que, gracias a la unión de dominios, se puede modificar múltiples aspectos de una molécula simple como su tropismo, su actividad, su estabilidad, su plegamiento, etc. (Schmidt, 2009). Los ejemplos más frecuentes son las proteínas fusionadas con fragmentos Fc de anticuerpos (Dumont et al., 2006), la unión a proteínas de transporte como la albúmina sérica humana (Weimer et al., 2008) o la unión con transferrina (Kim et al., 2010) para aumentar la vida media en plasma o aumentar el efecto terapéutico de las proteínas fusionadas. El hecho de que con una sola molécula pudiéramos capturar dos citoquinas simultáneamente, nos permitía reducir la dosis viral utilizada o a una misma dosis viral, obtener un efecto terapéutico mayor, ya que con una sola “molécula” (proteína de fusión) se podría obtener el mismo efecto que con dos.

Generalmente, las proteínas de fusión están formadas por las proteínas o dominios a unir y por las secuencias de unión llamadas *linkers*, ya que la unión directa de las proteínas puede implicar defectos en el plegamiento de los dominios, una baja tasa de producción o la pérdida de funcionalidad de uno o incluso de ambas proteínas (Chen et al. , 2013). De hecho, tal y como se observa en este trabajo, la generación de proteínas de fusión con GST (GST-sIL-7R y GST-sIL-23R-sIL-7R) para su purificación con *glutathione sepharose* implica una reducción en la producción *in vitro* tanto en células procariotas como eucariotas comparado con la productividad de la proteína GST por separado. Este fenómeno es habitual en los experimentos que implican la generación de proteínas GST. A pesar de ello, esta reducción no suele suponer un impedimento a las técnicas de purificación de proteínas GST debido a la elevada afinidad por la *glutathione sepharose* y a la alta concentración utilizada en este tipo de ensayos. Una peculiaridad de la proteína GST-sIL-23R-sIL-

7R es que se trata de una proteína formada por tres dominios independientes unidos por dos secuencias de unión. Este hecho hace que se reduzca mucho la productividad. Tal y como se observa cuando es producida *in vitro*, la cantidad total de proteína generada es menor que la cantidad producida en el caso de la proteína GST-sIL-7R y GST-sIL-23 por separado. En este caso, las cantidades generadas en este estudio no fueron suficientes para realizar ensayos de *pull-down*. Otro fenómeno habitual durante la purificación mediante *glutathione sepharose* es la fragmentación de los dominios de unión. Este hecho, aunque se produce de manera normal incluso utilizando inhibidores de proteasas durante la purificación, tampoco suele ser un impedimento de cara a realizar ensayos de *pull-down*. No obstante, en el caso de la proteína GST-sIL-23R-sIL-7R, se observó una fragmentación tan elevada que se purificó una cantidad muy baja de proteína total respecto de fragmentos de la misma imposibilitando la realización de ensayos de interacción. Una posible solución sería optimizar el protocolo tanto de producción como de purificación reduciendo las posibilidades de obtener la proteína fragmentada tras su purificación. Como alternativa, se podría diseñar un ensayo basado en la inmunoprecipitación con anticuerpos específicos y captura mediante *protein A sepharose* de las proteínas sIL-7R y sIL-23R-sIL-7R producidas por transfección sin necesidad de utilizar proteínas de fusión con GST.

3. GENERACIÓN DE VECTORES DE TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE LA EAE

Los vectores adenovirales son unos de los vectores más utilizados en terapia génica debido a su gran eficiencia de transducción, su elevada capacidad de clonación de genes externos y su facilidad de ser producidos en títulos elevados. Un hecho que se pudo observar en trabajos previos de nuestro grupo es la dificultad de trabajar con una estrategia de terapia génica que implica la administración de vectores virales en un modelo en el que se produce una activación elevada del sistema inmune como es el modelo de EAE. Los vectores

adenovirales son altamente inmunogénicos a causa de la presencia de genes virales en su genoma lo que implica su eliminación por el propio sistema inmune del huésped a las 2-3 semanas de la administración. Puesto que la aparición de los signos clínicos en el modelo de EAE se produce unos 10-12 días después de la inmunización, si la administración de los vectores adenovirales se hacía previa o simultánea a la inmunización no se conseguía la ventana terapéutica deseada. Así pues, se decidió administrar los vectores adenovirales dos días después de la inmunización. En estas nuevas condiciones se pudo observar que los animales morían a los pocos minutos de la administración debido a un *shock* provocado por una reacción masiva del sistema inmune frente a los virus circulantes. Este hecho coincide con lo observado previamente, donde la activación prematura del factor activador de plaquetas por las proteínas de la cápside viral producía una hipotensión que conducía a la inducción de este *shock* (Xu et al., 2010).

Debido a ello, se planteó un abordaje preventivo donde administramos los vectores una semana antes de la inducción de la enfermedad. En este caso, pudimos observar como aparecía un efecto terapéutico que retrasaba el inicio de la enfermedad. No obstante, tras aproximadamente una semana, el efecto se revertía y la enfermedad seguía un curso similar a la del grupo vehículo, probablemente debido a la eliminación de las células transducidas. Ello nos llevó a plantearnos el uso de otros vectores virales que nos permitieran una ventana terapéutica más adecuada.

Los vectores AAVs son menos inmunogénicos que los vectores adenovirales. Debido a ello, planteamos la utilización de vectores AAVs en un abordaje terapéutico temprano, tras la inmunización de los animales (día 5 y 9 pi) pero antes de la aparición de los signos clínicos. Sin embargo, a pesar de que los resultados obtenidos demuestran que los vectores AAVs pueden ser administrados en el modelo de EAE después de la inmunización con el antígeno ya que ninguno de los animales murió por shock, los bajos niveles de expresión sugieren que estos vectores no son capaces de transducir eficientemente después de la inmunización, probablemente debido a la activación del sistema inmune. De hecho, observamos grandes diferencias de expresión cuando comparamos animales administrados

antes de la inmunización (día -6 y -2) y animales administrados tras la inmunización (+5 y +9). Todo ello nos indica que es difícil la utilización de los AAVs en el modelo de EAE en un abordaje terapéutico. Otro aspecto a tener en cuenta a la hora de definir la ventana terapéutica adecuada es que los vectores AAVs requieren aproximadamente de dos semanas para alcanzar su máximo de expresión y así poder alcanzar los niveles adecuados de la proteína terapéutica. Quizás sería interesante utilizar un modelo de EAE remitente-recurrente (como el que se desarrolla en ratones SJL inmunizados con el péptido 139-151 de la PLP) para estudiar si la expresión de la molécula terapéutica, en un abordaje terapéutico, tendría un efecto beneficioso en la prevención de los brotes subsecuentes al desarrollo de la enfermedad.

A pesar del abordaje, evidentemente preventivo, existen algunos estudios que han demostrado diferencias en el estatus inmunológico de los pacientes con brotes activos y en periodo de remisión. No obstante, y a pesar de no haberse estudiado la mayoría de parámetros, resultaría lógico pensar que estas diferencias podrían permitir la transducción de vectores virales en pacientes en remisión (Bartosik-Psujek et al., 2005; Festa et al., 2009; Stilund et al., 2015). Así pues, el modelo de EAE utilizado en este estudio podría simular una situación previa a un brote, de manera que las terapias generadas en este trabajo podrían ser eficaces en la prevención de nuevos brotes. Además, debido a que entre brotes el sistema inmunológico podría no encontrarse exacerbado como ocurre durante un brote, se podría administrar un vector AAV sin afectar a su capacidad de transducción sobre las células diana.

4. APROXIMACIÓN TERAPÉUTICA CON VECTORES AAVs PORTADORES DE RECEPTORES SOLUBLES

En este trabajo se demuestra que la sobreexpresión, tanto de sIL-23R como de sIL-7R es capaz de reducir la gravedad de la EAE en un abordaje preventivo

(administrando los vectores virales tres semanas antes de la inducción de la enfermedad). Del mismo modo, observamos un efecto similar cuando se administró la proteína de fusión sIL-23R-sIL-7R. No obstante, no ha sido posible observar un efecto sinérgico claro de las dos moléculas combinadas debido, tal vez, a que en ambos casos se interfiere en la capacidad de supervivencia de las células Th17 (Arbelaez et al., 2015). Los resultados de este trabajo se correlacionan con los descritos previamente donde se utilizan anticuerpos neutralizantes contra IL-23 (Chen et al., 2006) e IL-7 (Ashbaugh et al., 2013; Lee et al., 2011) para reducir la severidad de diferentes enfermedades autoinmunes. En concreto, en este trabajo demostramos que el bloqueo, ya sea de ambas citoquinas por separado como combinadas mediante una proteína de fusión, mejora el pronóstico de la EAE gracias principalmente a un efecto sobre la incidencia. Así, se demuestra que aquellos animales tratados presentan una menor incidencia de la enfermedad respecto los animales tratados con el vector control. Además, en aquellos animales tratados con sIL-7R y con la proteína de fusión sIL-23R-sIL-7R que sí desarrollan la enfermedad, también observamos una menor gravedad de la misma. Este hecho diferencial entre sIL-23R y sIL-7R se podría correlacionar con los diferentes papeles que juegan IL-23 e IL-7 en la patogenia de la EAE. Concretamente, se ha demostrado que el inicio de la EAE depende totalmente de la IL-23, mientras que la IL-7 juega un papel determinante en la supervivencia y plasticidad de las Th17 (Arbelaez et al., 2015). Además, se han observado niveles elevados de IL-7 en el SNC tanto de ratones con EAE como de pacientes con EM (Kremlev et al., 2008), lo que estaría indicando que ambas citoquinas resultan críticas en el desarrollo de la enfermedad. Así pues, parece quedar claro que la IL-23 presenta un papel fundamental en el inicio de la enfermedad y que su efecto se produce principalmente a nivel periférico. De hecho, la reducción de la incidencia observada en aquellos animales tratados con sIL-23R podría relacionarse con el bloqueo del inicio de la enfermedad. Así, tal y como se demuestra, el bloqueo de IL-23 podría impedir que la EAE se inicie mientras que aquellos animales que finalmente sí consiguen desarrollar la enfermedad, la desarrollan con un perfil de gravedad mayor que el grupo control. De hecho, los animales que sí desarrollaron

la enfermedad presentaron un día de inicio más temprano y alcanzaron el nivel de gravedad máximo antes que el grupo tratado con el vehículo del mismo modo que se concluye en aquellos estudios que demostraron el papel de potenciación de la actividad de IL-7 mediante sIL-7R. Este efecto de todo o nada observado para el tratamiento con sIL-23R podría deberse a que en el presente estudio nos hemos movido alrededor de las dosis limitantes para el bloqueo total de la vía. Así, se deberían realizar más estudios aumentando la dosis de vector viral utilizado para comprobar si el efecto sobre la incidencia y, por tanto, sobre el bloqueo del desarrollo de la enfermedad es dosis dependiente y tratar de encontrar la dosis capaz de producir un efecto sobre todos los animales. Por otro lado, la IL-7 parece tener un papel mucho más importante cuando las células autoreactivas llegan al SNC, ya que existen numerosos estudios que demuestran que las células Th17 expresan un gran número de receptores para IL-7 cuando migran al SNC (Arbelaez et al., 2015). Además, también se han publicado hasta la fecha estudios que demuestran expresión de IL-7 y IL-7R en astrocitos y otras células del SNC (Ashbaugh et al., 2013). De hecho, un estudio de transferencia de células de médula ósea entre ratones demostró que aquellos ratones que únicamente presentaban IL-7R en células no hematopoyéticas, presentaban una forma más severa de EAE (Ashbaugh et al., 2013). En este sentido, los resultados descritos en este trabajo también apoyarían los datos publicados anteriormente ya que pudimos observar que los animales tratados con sIL-7R y con sIL-23R-sIL-7R, además de reducir la incidencia de la enfermedad, aquéllos que son incidentes presentaron una menor gravedad clínica que los animales tratados con sIL-23R que sí desarrollaron la enfermedad.

Gracias a los resultados obtenidos en este trabajo, se podría concluir que, ya sea bloqueando la IL-23 para evitar el inicio de la enfermedad como bloqueando la IL-7 a nivel periférico evitando, quizás, su paso al SNC y su acción sobre las células Th17 *in situ*, se podría detener parcialmente el desarrollo de la EAE.

Poniendo todo en conjunto, desde nuestro laboratorio propusimos la utilización de una terapia combinada capaz de bloquear ambas citoquinas. No obstante, el hecho de no encontrar ningún efecto sinérgico claro entre el bloqueo de ambas citoquinas

podría deberse a que la proteína terapéutica no se localiza en el SNC, ya sea porque nuestro vector no es capaz de atravesar la BHE y producir la proteína *in situ* o bien porque la proteína generada a nivel periférico no es capaz de llegar al SNC para realizar su función. Así pues, una posible alternativa de futuro sería la utilización de vectores capaces de atravesar la BHE como el AAV9 o el AAV10 a dosis más elevadas de manera que mediante una administración intravenosa se transduzcan tanto células periféricas como células del SNC pudiendo bloquear, además, la señalización de la IL-7 en las células del SNC que expresan su receptor.

Durante la realización de este trabajo se utilizó en un primer momento el vector AAV9 debido, precisamente a su capacidad de atravesar la BHE. En estudios previos de nuestro grupo, habíamos podido comprobar que la utilización de AAV9 sIL-23R a dosis de 1×10^{11} vg/animal no producía ningún efecto sobre el desarrollo de la EAE de manera que quisimos comprobar si sIL-7R o la proteína de fusión sIL-23R-sIL-7R sí eran capaces de modificar el curso de la EAE a las dosis que sIL-23R no presentaba diferencias respecto el control. No obstante, del mismo modo que con sIL-23R, ni sIL-7R ni la proteína de fusión sIL-23R-sIL-7R presentaron efecto terapéutico indicando la necesidad de incrementar la dosis. Además, debido a que la administración post-inmunización del vector no rendía los resultados deseados en cuanto a la expresión del transgén, se decidió centrar la terapia en bloquear la generación de las células autoreactivas a nivel periférico. Es por ello que se optó, finalmente, por un vector de tropismo hepático con el objetivo de generar los receptores solubles de forma sistémica. De cualquier modo, se deberían comprobar en un futuro los vectores AAVs de tropismo por el SNC (AAV9 o AAV10) a dosis de 5×10^{11} vg/animal y comparar los resultados con los obtenidos con el vector AAV8.

Los receptores solubles utilizados como elementos para capturar ligandos actúan de forma similar a los anticuerpos. Una de las principales ventajas, es que este tipo de moléculas no contienen secuencias externas capaces de generar una respuesta inmune en el huésped. Los anticuerpos, por el contrario, poseen las regiones constantes que, para evitar el fracaso de las terapias, se suelen sustituir por regiones "humanizadas". Aun así, se generan anticuerpos anti-idiotipo que pueden

neutralizar la función del anticuerpo y hacerle perder su eficacia terapéutica. Así pues, puesto que los receptores solubles están formados por las propias secuencias del receptor *wild-type*, no se espera ninguna región antigénica y, por tanto, ningún tipo de respuesta inmune que haga fracasar la terapia. En el caso de la proteína de fusión sIL-23R-sIL-7R, se debería realizar un estudio inmunológico para comprobar que no se hayan generado anticuerpos contra, al menos, la región de unión entre los dos dominios o *Flexible Linker*.

Actualmente, la EM es una enfermedad que no tiene cura y la mayoría de los tratamientos aprobados están destinados a la reducción del número y severidad de los brotes. Sin embargo, estos tratamientos no están exentos de efectos adversos graves como en el caso la mitoxantrona que se asocia a trastornos cardíacos (Ghalie et al., 2002), el natalizumab y su asociación a la leucoencefalopatía multifocal progresiva (Langer-Gould et al., 2005) o el alemtuzumab y su asociación con problemas tiroideos y otras patologías autoinmunes (Coles et al., 2017). Por otro lado, suponen un gran coste económico debido a que se trata de tratamientos de por vida con un elevado coste económico. Así pues, la utilización de una terapia basada en la terapia génica supondría una alternativa a la administración continuada tanto de anticuerpos como de proteínas recombinantes.

CONCLUSIONES

1. El sIL-23R generado es capaz de bloquear la acción de la IL-23 *in vitro*.
2. La administración de vectores en el modelo EAE de forma terapéutica no resulta efectiva debido a la baja capacidad de transducción posiblemente debido a la elevada activación de la respuesta inmune en el momento de la administración.
3. El tratamiento preventivo con vectores AAV2/8 que expresan los genes sIL-23R, sIL-7R y sIL-23R-sIL-7R reduce la incidencia de la EAE.
4. El tratamiento preventivo con vectores AAV2/8 que expresan los genes sIL-7R y sIL-23R-sIL-7R reduce la gravedad de los animales incidentes de la EAE.
5. El tratamiento mediante la proteína de fusión sIL-23R-sIL-7R no resulta mejor que el tratamiento con sIL-23R e sIL-7R por separado indicando que, en las condiciones utilizadas, no aparece un efecto sinérgico claro.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Vectores plasmídicos

Los plásmidos de partida a partir de los cuales se generaron los plásmidos de este trabajo son: pTG6600 (Transgene®), pKP1.4 Δ CMV, pXX6 (Xiao et al., 1998), pUPVRep2Cap8, pUPVRep2Cap9, pGV, pAAVCAG-PLK-WPRE. Los plásmidos generados a partir de éstos se muestran en una tabla en el *anexo*.

1.2. Vectores virales

En esta tesis se han utilizado vectores virales Ad5, AAV2/8 y AAV2/9. La lista de vectores generados y producidos en este trabajo se detallan en el *anexo*.

1.3. Cultivos celulares *in vitro*

HEK-293: (Human Embryonic Kidney cells 293). Línea celular inmortalizada de células embrionarias de riñón humano. Tienen incorporada la región E1 (early1) del genoma de los adenovirus necesaria para la producción de vectores virales.

HEK-293QB (Q-BIOgene®, Montreal, Quebec, Canadá): Clon de HEK-293 utilizado para la producción de adenovirus y su caracterización y para expresión proteica *in vitro*.

HEK-293AAV (CellBiolabs®, St. Diego, CA, USA): Clon de HEK-293 utilizado para la producción de los vectores adenoasociados.

A549: Línea celular inmortalizada derivada de adenocarcinoma de pulmón.

Cultivos primarios: Se realizaron cultivos primarios de esplenocitos de ratón para los estudios del efecto de las citoquinas y los receptores solubles sobre la señalización de la vía.

1.4. Animales

Para los experimentos de caracterización de los vectores *in vivo* se utilizaron ratones C57BL/6J de 8-11 semanas en el Servei d'Estabulari de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) bajo la aprobación del comité de ética y experimentación animal y humana de la UAB.

Para el modelo de EAE se utilizaron ratones hembra C57BL/6J de 6-10 semanas (Harlan Laboratories, Italia). Los experimentos se llevaron a cabo en el estabulario del Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron y se realizaron bajo la aprobación del comité ético de experimentación animal de dicho centro (números 38/14-CEEA y 73/15-CEEA). Los animales fueron estabulados con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, con temperatura controlada y alimentación y acceso a agua *ad libitum*.

2. MÉTODOS

2.1. Obtención y análisis de DNA

2.1.1. Minipreparaciones de DNA plasmídico por lisis alcalina

La técnica de las minipreparaciones de DNA plasmídico no comerciales para la obtención de DNA se caracteriza por un bajo nivel de pureza y poca cantidad total (<20 µg), aunque suficiente para realizar las digestiones con enzimas de restricción. Esta técnica se basa en una lisis alcalina a partir de un precultivo de bacterias y una posterior precipitación con isopropanol (2-propanol).

Reactivos: Solución I de resuspensión (4°C): 50 mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) pH=8,0, 10 mM EDTA (USB®, Cleveland, OH, USA), 100 µg/mL RNAsa A (Sigma Aldrich®). Solución II de lisis: 200mM NaOH (Panreac®, Barcelona, España), 1% SDS (p/v) (USB®). Solución III de precipitación proteica

(4°C): 3 M acetato potásico (Panreac®). Isopropanol y etanol absoluto (Panreac®).

Procedimiento: Se centrifuga 1,5 mL de cultivo de bacterias en un eppendorf durante 1 minuto a 12000g. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el precipitado con 200 µL de solución I de resuspensión. A continuación, se añaden 400 µL de solución II de lisis y se mezcla suavemente por inversión varias veces. Se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente y se añaden 400 µL de solución III de precipitación proteica. Se mezcla suavemente por inversión hasta homogeneizar y se incuba durante 10 minutos en hielo. Se centrifuga 10 minutos a 12000g y se recupera el sobrenadante traspasándolo a un tubo nuevo. Se añaden 0,6 volúmenes de isopropanol (600 µL) y se incuba 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga 10 minutos a 10000g y se descarta el sobrenadante. Se lava el pellet de DNA con etanol 70% y se centrifuga 5 minutos a 12000g. Se descarta el sobrenadante y se deja secar el precipitado. Finalmente, se resuspende el pellet con 15-30 µL de agua MilliQ.

2.1.2. Maxipreparaciones de DNA plasmídico

Esta técnica permite obtener DNA plasmídico en cantidades elevadas (250-1000 µg totales) y de gran pureza, lo cual resulta imprescindible para la transfección de líneas celulares. Se ha utilizado el kit comercial E.Z.N.A.™ Fastfilter (Omega Bio-Tek®, Norcross, GA, USA) y el kit comercial PhoenIX Maxiprep Kit (Q-BIOgene®).

Procedimiento: Procedimiento según instrucciones del fabricante.

2.1.3. Preparación de bacterias quimiocompetentes

Para que un plásmido pueda replicarse debe introducirse dentro de células bacterianas mediante el proceso denominado transformación. Estas células bacterianas deben adquirir previamente la capacidad de introducir DNA. Para ello, se utilizaron células TOP10 (Invitrogen®, Waltham, MA, USA) y células BJ5183 (Invitrogen®).

Reactivos: TFB1: 10 mM RbCl (Fluka®, Charlotte, NC, USA)), 50 mM MgCl₂ (Sigma-Aldrich®), 30 mM acetato potásico (Panreac®), 10 mM CaCl₂ (Sigma-Aldrich®), 15% glicerol (v/v) (Panreac®); pH=5,8. TFB2: 10 mM MOPS (Fluka®), 10 mM RbCl (Fluka®), 75 mM CaCl₂ (Sigma-Aldrich®), 15% glicerol (v/v) (Panreac®); pH=6,8. Tras su preparación, las dos soluciones se esterilizan mediante filtración con filtros de 0,22 µm (Merk®, Darmstadt, Alemania) y se almacenan a 4°C.

Procedimiento: Se crece durante toda la noche un precultivo de bacterias en 3 mL de Luria Broth (LB) sin antibiótico a partir de 5 µL del stock comercial. Al día siguiente, se utiliza el precultivo para inocular 200 mL de LB sin antibiótico y se incuba a 37°C en agitación (incubador orbital) hasta que el cultivo alcanza una densidad óptica (DO_{600nm}) de 0,5 correspondiente a la fase exponencial de crecimiento. A continuación, se deja enfriar el cultivo en hielo durante 5 minutos para detener el crecimiento bacteriano y se reparte en falcons de 50 mL. Se centrifuga 5 minutos a 4000g a 4°C y se descarta el sobrenadante por decantación manteniendo las bacterias en hielo en todo momento. Posteriormente, se resuspende el pellet en 30 ml de TFB1 por cada 100 mL de cultivo centrifugado y se incuba en hielo durante 90 minutos. Seguidamente, se centrifuga 5 minutos a 4000g a 4°C, se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet celular con 4 mL de TFB2 por cada 100 mL de cultivo original. Por último, se reparte la solución en alícuotas de 100 µL en tubos eppendorf previamente enfriados y se almacenan a -80°C.

2.1.4. Transformación de bacterias por choque térmico

La transformación por choque térmico es la introducción de DNA en bacterias quimiocompetentes a través de un incremento brusco de temperatura (42°C) durante un periodo breve de tiempo.

Reactivos: Placas de Petri (Nunc®, Roskilde, Dinamarca) de LB-agar con ampicilina: Luria Broth (Miller's LB Broth) (Panreac®), Agar (Panreac®), ampicilina 100 µg/mL (USB®). Medio de crecimiento LB líquido.

Procedimiento: Se descongelan los viales de células quimiocompetentes durante 10 minutos en hielo y se añade 5-10 μ L de DNA plasmídico. Se incuba en hielo 30 minutos y a continuación se introducen los viales en un baño a 42°C durante 90 segundos (choque térmico). Inmediatamente, se ponen en hielo y se enfrían durante 5 minutos. Se añaden 200 μ L de LB sin antibiótico y se incuba durante 1 hora a 37°C en agitación. De esta manera, las células se recuperan del choque térmico y empiezan a expresar la resistencia al antibiótico. Finalmente, se siembran las células en placas de LB-agar con ampicilina y se incuban durante toda la noche en una estufa a 37°C.

2.1.5. Electroforesis de DNA en gel de agarosa

Para separar fragmentos de DNA de diferente tamaño se utilizó la técnica de la electroforesis en gel de agarosa. El DNA posee carga negativa y se somete a un campo eléctrico para que migre a través de la matriz en dirección al ánodo de manera proporcional a su tamaño. El porcentaje de agarosa utilizado varía en función de los fragmentos a separar.

Reactivos: Agarosa (p/v) (Sigma-Aldrich®). Tampón de electroforesis TAE 1x: 40 mM Tris-acetato, pH=8,0; 0,1 mM EDTA. Tampón de carga 10x: 50% glicerol (v/v) (Panreac®), 100 mM EDTA pH=8,0 (USB®), 1%SDS (p/v) (USB®), 0.1% Azul de Bromofenol (p/v) (Sigma-Aldrich®), 0,1% Xilene Cianol (p/v) (Sigma-Aldrich®). GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas®, Waltham, MA, USA), GeneRuler 100 pb DNA Ladder (Fermentas®), Red Safe 20000x (Intron Biotechnology®, Seongnam, Corea del Sur).

Procedimiento: Para la preparación del gel se funde la agarosa con el porcentaje deseado (p/v) en tampón TAE 1x. Una vez la mezcla se encuentra atemperada, se añade el Red Safe (1x) y se vierte en un portageles colocando un peine adecuado para realizar los pozos. Tras su polimerización, se retira el peine y se añade TAE 1x hasta cubrir el gel. A continuación, se cargan las muestras de DNA en los pozos juntamente con el tampón de carga a una concentración final 1x y se aplica

corriente de 60-120 V el tiempo necesario para la separación de los fragmentos de DNA. Finalmente, se observa el gel en un transiluminador mediante luz UV.

2.1.6. Purificación de fragmentos de DNA

Los métodos de purificación de fragmentos de DNA se utilizan para separar el DNA de otros componentes presentes en la solución. Se utilizó esta metodología para asilar el DNA de la agarosa tras separar un fragmento en un gel de electroforesis.

La purificación de bandas se llevó a cabo con el kit comercial GENE CLEAN Turbo kit (Q-BIOgene®) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

2.1.7. Cuantificación de la concentración de DNA

La cuantificación de DNA procedente de maxipreparaciones, minipreparaciones, etc. se realiza mediante lectura en NanoDrop (ThermoFisher®, Waltham, MA, USA) a una longitud de onda (λ) de 260 nm. La pureza se cuantifica a través de las ratios OD_{260/280} y OD_{260/230}.

2.1.8. Digestión mediante enzimas de restricción

Las endonucleasas de restricción o enzimas de restricción son enzimas que actúan reconociendo secuencias cortas y específicas de nucleótidos rompiendo la cadena en lugares concretos. Para la digestión se utilizaron entre 4 y 10 U de enzima por 1 μ g de DNA. La temperatura y los tampones necesarios para la digestión son establecidos por el fabricante. El tiempo de digestión varía desde una hora a 20 dependiendo de la cantidad de enzima utilizada, el tipo de enzima y la concentración de DNA utilizada. Se utilizaron diferentes enzimas de restricción de Fermentas® y New England Biolabs® (Ipswich, MA, USA).

2.1.9. Clonación de fragmentos de DNA

El objetivo de esta técnica es unir dos segmentos de DNA para formar una única molécula de DNA con la capacidad de replicarse en bacterias. Las construcciones

generadas en este trabajo se han obtenido a través de dos métodos de clonación en función del tamaño de las moléculas a unir: clonación por ligación (moléculas pequeñas) y clonación por recombinación homóloga (moléculas grandes).

2.1.9.1. Clonación por ligación

Procedimiento: Se obtiene el vector y el inserto de sus respectivos plásmidos mediante digestión con enzimas de restricción que dejen extremos compatibles. Se separan los fragmentos de DNA mediante electroforesis en gel de agarosa y se purifican las bandas deseadas. Para evitar la religación del vector, éste se desfosforila mediante fosfatasa alcalina FastAP (Fermentas®). Para la reacción de ligación, se utiliza T4 DNA Ligasa (New England Biolabs®), 50 ng de vector y cantidades variables de inserto. Se prepara una condición equimolar (1:1) de vector e inserto y otra donde el inserto se encuentra en exceso (1:2 ó 1:3). Además, se incluye una condición de vector solo para calcular la eficiencia de religación y otra cantidad de vector solo sin ligasa para comprobar la cantidad de vector sin digerir. Las diferentes reacciones se incuban a 16°C durante al menos 4 horas y posteriormente se transforman en células quimiocompetentes TOP10 que crecerán en placas de LB-agar con el antibiótico correspondiente. Seguidamente, se inoculan precultivos líquidos de LB con antibiótico a partir de colonias de las placas transformadas con las condiciones con inserto y se dejan crecer (37°C, O/N, agitación). Finalmente, se extrae el DNA plasmídico a través de minipreparaciones y se comprueba la secuencia con enzimas de restricción.

2.1.9.2. Clonación por recombinación homóloga en bacterias

Procedimiento: Para la generación de los vectores adenovirales, el último paso de clonación se realiza mediante recombinación homóloga debido al gran tamaño de los plásmidos implicados. Se linealizan los plásmidos pKP1.4 (portador del genoma del adenovirus) y pTG6600 (portador del transgén) con enzimas de restricción que dejen libre las zonas de recombinación. Para la recombinación se utilizan 50 ng de vector pKP1.4, una condición equimolar (1:1) y otra con el inserto en exceso (1:2

ó 1:3). Se incluyen, además, dos condiciones control (cada uno de los componentes por separado). Cada condición se transforma en células BJ5183 recombinasa positivas y se siembran en placas de LB-agar con ampicilina. A continuación, se crecen las colonias que hayan crecido en precultivos de 3 mL de LB con ampicilina O/N a 37°C en agitación y se extrae el DNA plasmídico para ser analizado mediante digestión con enzimas de restricción.

2.1.10. Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR

La PCR o reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*) es una técnica en la cual se amplifican fragmentos de DNA gracias al uso de unos oligonucleótidos o *primers* que hibridan de forma complementaria con el fragmento de DNA a amplificar y a la acción de una polimerasa. Esta enzima incorpora los nucleótidos necesarios hasta llegar al final de la cadena de DNA que está amplificando, repitiendo el proceso hasta 25-35 ciclos por PCR obteniendo el DNA deseado. Las PCRs del presente trabajo han sido realizadas utilizando los siguientes reactivos y condiciones:

Reactivos (concentración/cantidad utilizada):

Tampón TaqPol 10x (1x)

MgCl₂ 25 mM (1 mM)

Taq Pol 5 U/μL (0.03 U)

dNTPs 25 mM (0.2 mM)

Oligonucleótidos (0.2 μM)

DNA molde: 10 pg (DNA plasmídico) o 50 ng (cDNA o DNA genómico)

Condiciones de amplificación:

98°C → 10 minutos

(98°C → 15 segundos; 58°C → 15 segundos; 72°C → 30 segundos) 30 ciclos

72°C → 10 minutos

Mantener a 4°C o congelar -20°C

2.1.11. Secuenciación

La secuenciación de las diferentes secuencias generadas se realizó en el *Servei de Seqüenciació de la UAB*.

2.1.12. Extracción de genomas virales en células de cultivo

Reactivos: Tampón de lisis (0,6% SDS (p/v), 10 mM EDTA), PBS, NaCl 5 M, Fenol-cloroformo-isoamil alcohol (25:24:1) (Panreac®), Acetato Sódico 3 M, Etanol absoluto frío (Panreac®).

Procedimiento: Se aspira el sobrenadante de las células y se lavan los restos de medio con PBS. Una vez retirado por completo el medio, se aspira el PBS y se lisan las células directamente sobre la placa con la cantidad de tampón de lisis necesaria. Se recoge el lisado con la ayuda de un *scraper* y se añaden 0,25 mL de NaCl 5 M por cada ml de tampón de lisis y se incuba en hielo durante al menos 3 horas (o durante toda la noche a 4°C). Se centrifuga a 16000g durante 10 minutos a 4°C y se recoge el sobrenadante en un tubo nuevo. Posteriormente, se añade un volumen igual de Fenol-cloroformo-isoamil alcohol frío y se mezcla con la ayuda de un vórtex durante 15 segundos. Se centrifuga a 16000g durante 20 minutos a 4°C y se recupera la fase acuosa (Fase superior). A continuación, se precipita el DNA con 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y 1/10 volúmenes de acetato sódico 3 M y se centrifuga a 16000g durante 10 minutos a 4°C. Se descarta el sobrenadante por decantación, se lava el pellet con etanol 70% y se deja secar a temperatura ambiente. Por último, se resuspende el DNA con agua MilliQ.

2.1.13. Extracción de genomas virales en tejido. Método de Hirt

Reactivos: Tampón de lisis (0,6% SDS (p/v), 10 mM EDTA), Proteinasa k 20 mg/mL (Roche®, Basel, Suiza), NaCl 5 M, Fenol-cloroformo-isoamil alcohol (25:24:1) (Panreac®), Acetato Sódico 3 M, Etanol absoluto frío (Panreac®).

Procedimiento: Se corta una pequeña porción de tejido de aproximadamente 100-500 mg con la ayuda de un bisturí manteniendo el tejido congelado y se pesa en

una balanza de precisión. Se añaden 100 μL de tampón de lisis y 20 μL de Proteinasa k por cada 100 mg de tejido y se incuba a 55°C durante 3 horas en agitación. Posteriormente, se inactiva la Proteinasa k incubando a 95°C durante 5 minutos y se añaden 0,25 mL de NaCl 5 M por cada mL de tampón de lisis. Se incuba en hielo durante al menos 3 horas y se centrifuga a 16000g durante 10 minutos a 4°C. Seguidamente, se recoge el sobrenadante en un tubo nuevo y se añade un volumen igual de Fenol-cloroformo-isoamil alcohol frío. Se mezcla con la ayuda de un vortex durante 15 segundos y se centrifuga a 16000g durante 20 minutos a 4°C. A continuación, se recupera la fase acuosa (Fase superior) y se precipita el DNA con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío y 1/10 volúmenes de acetato sódico 3 M y se centrifuga a 16000g durante 10 minutos a 4°C. Se descarta el sobrenadante por decantación, se lava el pellet con etanol 70% y se deja secar a temperatura ambiente. Por último, se resuspende el DNA con agua MilliQ.

2.1.14. Cuantificación de DNA mediante PCR cuantitativa (qPCR)

La cuantificación de DNA se realiza utilizando una sonda fluorescente que se intercala entre las cadenas de DNA y un termociclador capaz de leer fluorescencia.

Reactivos: SYBR Green Master Mix (BioRad®, Hercules, CA, USA)

Como material de partida se utiliza una muestra de DNA o mRNA retrotranscrito (cDNA) que se diluye a una concentración de 50 ng/ μL en un volumen final de 1 μL . Se prepara la solución de SYBER Green Master Mix 1x con los *primers* correspondientes en un volumen final de 9 μL por reacción y se añade el DNA de la muestra. Se realiza una amplificación de 35 ciclos del DNA utilizando la temperatura óptima de la pareja de *primers* utilizada y se lee la fluorescencia.

2.2. Obtención y análisis de RNA

El RNA es muy sensible a la degradación por la acción de RNAsas y, por tanto, todo el material utilizado para el estudio de RNA fue libre de RNAsas. Las superficies se trataron con RNaseZAP (Sigma-Aldrich®) y las muestras se mantuvieron en hielo.

2.2.1. Extracción de RNA de células de cultivo

Reactivos: PBS, Trizol (Invitrogen®), Fenol-cloroformo-isoamil alcohol (25:24:1) (Panreac®), Isopropanol (Panreac®), Etanol absoluto (Panreac®).

Procedimiento: Se retira el sobrenadante del cultivo celular y se lavan las células sin separarlas de la placa con PBS frío varias veces hasta que no se observan restos de medio de cultivo. Se aspira el sobrenadante y se añaden 500 µL de Trizol directamente sobre las células que se lisarán con la ayuda de un *scraper*. Se recoge el lisado en un tubo eppendorf y se centrifuga 10 minutos a 12000g a 4°C. Se recupera el sobrenadante y se añaden 0,1 mL de cloroformo por cada ml de Trizol utilizado. Se agita unos 15 segundos con vórtex y se incuba 3 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se centrifuga 15 minutos a 12000g a 4°C y se recupera la fase acuosa de cada muestra (fase superior). Se añaden 0,25 mL de isopropanol por cada ml de Trizol inicial y se incuba 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se precipita el RNA centrifugando 10 minutos a 12000g a 4°C y se decanta el sobrenadante. Se lava el pellet con etanol 70% y se centrifuga 5 minutos a 12000g a 4°C. Se elimina el sobrenadante por decantación y se deja secar el pellet. Una vez seco, se resuspende el pellet con 25 µL de agua RNasa-free. Finalmente, se mide la concentración y la pureza mediante NanoDrop y se almacena a -80°C.

2.2.2. Extracción de RNA de células de tejido

Reactivos: Trizol (Invitrogen®), Fenol-cloroformo-isoamil alcohol (25:24:1) (Panreac®), Isopropanol (Panreac®), Etanol absoluto (Panreac®).

Procedimiento: Se corta una porción de tejido intentando no descongelar por completo la muestra y se introduce en un tubo. Se pesa y se añade 100 μ L de Trizol por cada 100 mg de tejido. Posteriormente, se disgrega el tejido mecánicamente utilizando un TissueLyser LT (Qiagen®, Hilden, Alemania) realizando varios ciclos de 10 minutos manteniendo las muestras en hielo entre cada ciclo para evitar que se calienten. Una vez la solución se observa homogénea, se añade 0,1 mL de cloroformo por cada ml de Trizol utilizado. Se agita unos 15 segundos con vórtex y se incuba 3 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se centrifuga 15 minutos a 12000g a 4°C y se recupera la fase acuosa de cada muestra (fase superior). Se añaden 0,25 mL de isopropanol por cada ml de Trizol inicial y se incuba 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se precipita el RNA centrifugando 10 minutos a 12000g a 4°C y se decanta el sobrenadante. Se lava el pellet con etanol 70% y se centrifuga 5 minutos a 12000g a 4°C. Se elimina el sobrenadante por decantación y se deja secar el pellet. Una vez seco, se resuspende el pellet con 25 μ L de agua RNAsa-free. Finalmente, se mide la concentración y la pureza mediante NanoDrop y se almacena a -80°C.

2.2.3. Tratamiento con DNAsa I de muestras de RNA

La DNAsa I es una endonucleasa humana que corta tanto el DNA monocadena como doble cadena en regiones adyacentes a pirimidinas. El tratamiento con DNAsa I se realizó para eliminar la contaminación de genomas virales en muestras de RNA.

El tratamiento con DNAsa I se realizó utilizando el DNAsa I (Sigma-Aldrich®) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2.4. Retrotranscripción de muestras de RNA

La retrotranscripción de RNA para obtener cDNA se llevó a cabo con el kit comercial *Omniscript Reverse Transcription cDNA Synthesis Kit* (Qiagen®), siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante.

2.3. Obtención y análisis de proteínas

En este trabajo se ha realizado la extracción de proteínas totales de cultivos celulares establecidos, así como de muestras de tejido.

2.3.1. Extracción de proteínas

Reactivos: Tampón de lisis RIPA: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0,25% deoxicolato sódico pH=7,4, tableta con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche®), sonicador.

Procedimiento: En el caso de los extractos celulares, las células se centrifugan 5 minutos a 200g, se descarta el sobrenadante y el pellet se resuspende en 100 µL de tampón de lisis RIPA. En el caso de las muestras de tejido, se corta una porción de tejido evitando la descongelación de la muestra y se añaden 100 µL de tampón de lisis por cada 100 mg de tejido. Una vez las muestras se encuentran con el tampón de lisis, se homogenizan mediante sonicación utilizando pulsos de 10 a 30 segundos manteniendo las muestras en hielo. Se realizan tantos ciclos como sea necesario hasta que la muestra se encuentre totalmente homogeneizada. Posteriormente, se centrifuga 15 minutos a 12000g a 4°C para eliminar los restos, se recoge el sobrenadante y se almacena hasta su cuantificación.

2.3.2. Cuantificación de proteínas

Todos los extractos proteicos se cuantificaron con el método colorimétrico *BCA™ Protein Assay Kit* (ThermoFisher®) que está basado en la reacción de Biuret. Esta reacción consiste 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. Los iones Cu^+ son quelados por cada dos moléculas de BCA favoreciendo el viraje de la solución verdosa a violeta que absorbe a 562 nm.

Procedimiento: Se parte de una recta patrón que consiste en diluciones seriadas (desde 2 mg/ml hasta 0,0625 mg/mL) a partir de un stock de albúmina bovina

sérica (BSA) proporcionada por el kit. Se preparan, también, diluciones de las muestras proteicas a cuantificar (generalmente 1/10, 1/30 y 1/60). Se prepara la mezcla de reacción siguiendo las instrucciones del fabricante y se añaden 200 μL por cada 10 μL de muestra. Se incuba 30 minutos a 37°C y se mide la absorbancia a 562 nm en un lector de placas.

2.3.3. Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)

La electroforesis desnaturizante o SDS-PAGE se fundamenta en la capacidad de movilización de las partículas tras la aplicación de un campo eléctrico. La presencia de un detergente aniónico como es el SDS, provoca la desnaturización de las proteínas y les otorga carga negativa provocando que las proteínas migren en función de su tamaño.

Reactivos: Solución Acrilamida:Bisacrilamida (29:1) (Amresco®, Solom, OH, USA), tampón SDS-Tris-HCl pH=8,8 4x (1,5M Tris, 0,4% SDS), tampón SDS-TrisHCl pH=6,8 4x (0,5M Tris, 0,4% SDS), APS 10% (Amresco®), tetrametil-etilen-diamina (TEMED) (Sigma-Aldrich®), tampón de carga 5x [20% glicerol, 10% SDS, 0,32% 2-mercatoetanol (Sigma-Aldrich®), 0,02% Bromofenol blue (Sigma-Aldrich®)], marcador de peso molecular PageRuler Pre-Stained (Fermentas®), tampón de electroforesis 1x (25 mM Tris, 192 mM glicina, 1% SDS).

Procedimiento: Por un lado, se prepara un gel separador (o *running*) de acrilamida a un porcentaje del 10% con un grosor de 1,5 mm. Por otro lado, se prepara un gel de apilamiento (o *stacking*) donde se cargan las muestras. Para la polimerización de añade TEMED y APS (5 y 25 μL respectivamente). En paralelo, se prepara una cantidad determinada de cada muestra (10-50 μg de proteína total) con tampón de carga y se hierve a 99 °C durante 10 minutos para desnaturizar las proteínas y deshacer los puentes disulfuro. Una vez cargadas en el gel, se realiza la electroforesis a un voltaje inicial de 100 V durante unos 20 minutos hasta que las proteínas entren en el gel separador para posteriormente aumentar el voltaje a 120-140 V durante 1h-1h30min en función de las bandas a detectar.

2.3.4. Tinción de geles PAGE con Azul de Comassie (Comassie Blue)

La tinción con azul de Comassie es un método que permite la visualización de bandas proteicas en geles de poliacrilamida.

Reactivos: Solución de tinción (Comassie Brilliant Blue R.250 (BioRad®), metanol 40%, ácido acético 10%), solución desteñidora (Metanol 40%, ácido acético 10%).

Procedimiento: Se incuba el gel de acrilamida después de la electroforesis en solución de tinción durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, se retira la solución de tinción y se le añade solución desteñidora que se irá renovando cada vez que adquiera una tonalidad azulada. Se incuba el gel con la solución desteñidora a temperatura ambiente y en agitación constante hasta que el fondo del gel sea transparente y las bandas proteicas aparezcan teñidas en azul. Para conservar el gel, se retira la solución desteñidora y se almacena el gel en agua destilada a 4°C.

2.3.5. Electrotransferencia

Reactivos: Transblot semidry transfer cell (BioRad®), membranas PVDF (GE Healthcare®, Chicago, IL, USA), metanol, tampón de transferencia 1x (25 mM Tris, 192 mM Glicina), papel Protean XL Size (BioRad®).

Procedimiento: Las proteínas presentes en el gel de acrilamida se transfieren a una membrana de PVDF previamente activada (sumersión en metanol 10 segundos, seguido de un lavado de 5 min en agua destilada y 15 min en tampón de transferencia 1x). El gel de acrilamida con las proteínas también se equilibra durante 15 min en tampón de transferencia junto con el papel Protean. Posteriormente, se montan las capas necesarias para la transferencia (de abajo a arriba): papel, membrana de PVDF, gel y otro papel. Con la ayuda de un rodillo se eliminan las burbujas que quedan entre las capas y se realiza la transferencia durante 45 minutos a 25 V. Posteriormente, se observan las proteínas transferidas a la membrana mediante tinción con Ponceau (sumersión durante 5 minutos y eliminación con agua destilada).

2.3.6. Inmunodetección

Reactivos: TBS (50 mM Tris, 136 mM NaCl, 40 mM KCl pH= 7,5), leche desnatada en polvo, albúmina bobina sérica (BSA) (Sigma-Aldrich®), Tween-20 (Sigma-Aldrich®), solución de bloqueo (TBS, 0,1% Tween-20, 10% leche o BSA), anticuerpos primarios y secundarios, solución de revelado *Immobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrate* (Millipore®, Burlington, MA, USA), fotodocumentador de quimioluminiscencia BioRad (programa informático: QuemiDoc XRS).

Procedimiento: Una vez transferida la membrana, se procede al bloqueo sumergiéndola en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente en constante agitación para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo primario. La solución de bloqueo utilizada (leche desnatada en polvo o BSA) dependerá del anticuerpo primario. Tras el bloqueo de la membrana, se incuba con 5-10 mL de dilución del anticuerpo primario en solución de bloqueo a la concentración indicada por el fabricante a 4°C O/N en agitación. Al día siguiente se realizan 3 lavados de la membrana con TBST durante 10 minutos y se incuba con la dilución del anticuerpo secundario en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizan 3 lavados de 10 minutos con TBST y se procede al revelado. Para ello, se mezclan los dos componentes de la solución de revelado *Immobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrate* (Millipore®) y se procede a la detección con un fotodocumentador de quimioluminiscencia. Los diferentes anticuerpos utilizados a lo largo de esta tesis se detallan en el *anexo*.

2.3.7. Deshibridación de la membrana de PVDF o Stripping

La deshibridación de la membrana de PVDF es un método para la eliminación de los anticuerpos unidos a las proteínas transferidas con el objetivo de hibridar sobre proteínas que coinciden en tamaño con las anteriores.

Reactivos: Tampón de deshibridación (62,5 mM Tris, 100 mM 2-mercaptoetanol, 2% SDS).

Procedimiento: Se sumerge la membrana en solución de deshibridación durante 2 horas a 55°C. Seguidamente se activa nuevamente la membrana por sumersión en metanol y se realizan lavados con TBST para eliminar el metanol. Posteriormente, se bloquea de nuevo la membrana con solución de bloqueo y se incuba con el nuevo anticuerpo primario tal y como se ha descrito anteriormente.

2.3.8. Producción y purificación de proteínas GST

Reactivos: LB+ampicilina+cloranfenicol, 10 μ M de IPTG (producción en bacterias), DMEM 1% FBS, PEI 1x (producción en HEK-293), Glutathione-sepharose 4B (Sigma-Aldrich®), buffer de lavado (50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0,5 M NaCl, 1% Tritón X-100, pH 7,5), buffer de elución (50 mM Tris-HCl, 0,1 mM EGTA, 0,275 M sacarosa, 0,1% β -mercaptoetanol, pH 8), buffer de elución con glutatión (buffer de elución + 40 mM glutatión reducido).

Procedimiento: Se pueden producir proteínas tanto en células eucariotas como en procariotas utilizando un plásmido con un promotor específico. En el caso de células procariotas, se transforma el plásmido en células BL21 y se crece una colonia en cultivo líquido LB suplementado con ampicilina y cloranfenicol hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,5. Se añade 10 μ M de IPTG al cultivo para inducir la expresión de proteínas GST y se incuba el tiempo necesario. Una vez concluido el tiempo de expresión, se centrifuga el cultivo durante 10 minutos a 3000g y a 4°C y se descarta el sobrenadante. Se resuspende el pellet bacteriano en buffer de lisis, se y sónica hasta obtener una suspensión homogénea. Finalmente, se centrifuga durante 10 minutos a 3000g y a 4°C para recuperar el sobrenadante (Lisado final). En el caso de producciones en células eucariotas se produce a través de transfección en células HEK-293 tal y como se especifica en el apartado “2.4.4 Introducción de DNA plasmídico en células por transfección”. Una vez incubado el cultivo después de la transfección, se retira el sobrenadante por aspiración y se lisa el cultivo con buffer de lisis y la ayuda de un sonicador. Se centrifuga a 3000g durante 10 minutos a 4°C y se recupera el sobrenadante (Lisado final).

Una vez obtenido el lisado final, el tratamiento de purificación es el mismo tanto para producciones en células procariotas como eucariotas. Las proteínas GST presentes en el extracto celular se purifican por afinidad a la *glutathione-sepharose 4B*, incubando 1-2 horas a 4°C en un agitador. A continuación, se lava la resina 3 veces con buffer de lavado para eliminar las proteínas libres no unidas. Seguidamente, se realiza un lavado con buffer de elución y, finalmente, se eluyen las proteínas GST incubando la resina con buffer de elución con glutatión durante 25 minutos en el agitador, tras lo cual se recupera el sobrenadante y se almacena a -80°C hasta su utilización.

2.3.9. Actividad β -galactosidasa en muestras de tejido

Para medir la actividad β -galactosidasa en extractos de proteínas, se utilizó el kit Galacto-Light Plus™ β -Galactosidase Reporter Gene Assay System (ThermoFisher Scientific®) siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

2.4. Técnicas generales de cultivo celular

La manipulación de cultivos celulares fue realizada en las instalaciones de nivel de seguridad biológica 2 (NSB2) de la Unidad de Producción de Vectores (UPV) con el fin de mantener las condiciones de asepsia y esterilidad.

2.4.1. Mantenimiento de cultivos celulares en monocapa

Reactivos: Medio de crecimiento: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) de alto contenido en glucosa (4,5 mg/mL) suplementado 10 % (v/v) de suero fetal bovino (FBS) (PAA®, Minneapolis, MN, USA), 1% penicilina (100 U/mL) y 1% estreptomina 100 μ g/mL) (PAA®). Tampón fosfato salino (D-PBS): 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 1,7mM KH₂HPO₄ pH 7,4). Tripsina-EDTA (1x) (PAA®). Solución Salina 1x (1,4 M KCl, 0,7 M NaCl).

Procedimiento: El mantenimiento de las líneas estables se realizó en placas de 15 cm. En el caso de las líneas celulares HEK-293, se aspira el medio y se realiza un lavado con 10 mL de D-PBS. Se elimina el D-PBS por aspiración y se añaden 10 mL de solución salina 1x. A continuación, se resuspenden las células por acción mecánica y se traspasan a un tubo falcon. Por otro lado, en el caso de la línea celular A549, se aspira el medio y se realizan lavados con D-PBS hasta que deja de ser perceptible el color del medio de cultivo. Se aspira el D-PBS y se añaden 3 ml de Tripsina-EDTA a la placa. Se incuba a 37°C durante 5 minutos y se recogen de la placa con la ayuda de 10 mL de medio de cultivo para inhibir la acción de la tripsina. En ambos casos, se centrifuga durante 5 minutos a 200g, se descarta el sobrenadante por aspiración y se añaden la cantidad de medio necesaria para diluir las células. Se añaden 17 mL de medio de crecimiento a una nueva placa de cultivo de 15 cm y se añade la cantidad necesaria de células en función del día en que se vuelvan a utilizar. Se reparten las células en la placa mediante movimientos suaves y se incuba en un incubador de células a 37° y 5% de CO₂ hasta su nuevo uso o nuevo pase de mantenimiento.

2.4.2. Criopreservación: congelación y descongelación de células

Reactivos: Medio de congelación: FBS con 10% DMSO

Procedimiento de congelación: De manera similar a los descrito en el apartado de mantenimiento de líneas celulares, las células de la placa se disgregan mecánicamente con D-PBS o mediante tratamiento con tripsina y se traspasan a un tubo falcon. Se centrifugan durante 5 minutos a 200g, se elimina el sobrenadante por aspiración y se resuspenden las células en 1 mL de medio de congelación. Rápidamente se traspasa la suspensión a un criotubo de congelación, se deposita en un depósito de congelación gradual y se congela a -80°C. Al día siguiente, se extraen los tubos del depósito de congelación gradual y se almacenan en un congelador a -80°C.

Procedimiento de descongelación: Se descongela el vial de células en un baño de 37°C y se traspasa rápidamente el contenido a un tubo falcon con 10 mL de medio

de cultivo. Se centrifuga durante 5 minutos a 200g, se elimina el sobrenadante, se resuspende el pellet celular en medio de crecimiento y se siembran en una placa. Cuando las células llegan al porcentaje de confluencia deseado, se realiza el protocolo de mantenimiento.

2.4.3. Cultivos primarios de leucocitos de ratón o cultivos de esplenocitos

Reactivos: Filtros de 70 μm , filtro de 40 μm , PBS suplementado con 10% FBS, medio de crecimiento (DMDM 10% FBS suplementado con 1% penicilina (100 U/mL) y 1% estreptomina 100 $\mu\text{g/mL}$).

Procedimiento: A este tipo de cultivos se les conoce como suspensiones de células individualizadas de bazo, cultivos de esplenocitos o cultivos primarios de leucocitos de bazo. En primer lugar, se disgrega mecánicamente el tejido con un filtro de 70 μm con sobre una placa de cultivo. Con la ayuda de 10 mL de PBS, se realizan diferentes pasadas a través del filtro para conseguir una solución individualizada de células. Una vez separados los restos de tejido, se centrifuga la solución a 200g durante 5 minutos a 4°C. Se aspira el sobrenadante y se lisan los eritrocitos resuspendiendo la suspensión celular en 1 mL agua MilliQ durante 5-10 segundos. Transcurrido ese tiempo, se añaden 10 mL de PBS suplementado con 10% de FBS para detener la lisis y se centrifuga la suspensión a 200g durante 5 minutos a 4°C. Se retira el sobrenadante y se sustituye por medio de crecimiento sembrando las células en las placas de cultivo.

2.4.4. Introducción de DNA plasmídico en células por transfección

Reactivos: Polietilenimina (PEI) 10 mM (PolyScience®, Warrington, PA, USA), NaCl 0.9% (B. Braun®, Melsungen, Alemania). Medio de transfección: Medio DMEM (PAA®) sin FBS ni antibióticos.

Procedimiento: Se siembran previamente células permisivas de manera que en el momento de la transfección se encuentren a una confluencia aproximada del 70%. Se transfectan 6 μg de DNA por cada 10^6 células. Se disuelve el DNA en 200 μL NaCl

0,9% por cada 6 µg de DNA. Por otro lado, en un tubo aparte se prepara el PEI disolviéndolo en NaCl 0,9% (2,25 µL de PEI 10 mM por cada µg de DNA) en el mismo volumen final que la mezcla de DNA. Se añade lentamente la disolución de PEI sobre la de DNA y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente con el fin de formar los complejos PEI-DNA. Posteriormente, se aspira el medio de cultivo de la placa a transfectar y se añade una cantidad de medio de transfección suficiente para cubrir la monocapa celular. Se añade la cantidad de mezcla de transfección correspondiente a la cantidad de células de la placa y se incuba a 37°C y 5% de CO₂ durante 3 horas. Finalmente, se aspira el medio, se sustituye por medio de cultivo (DMEM 10% FBS) y se deja incubar a 37°C y 5% de CO₂ el tiempo necesario según el experimento.

2.4.5. Ensayo de bloqueo de la actividad de IL-23 con sIL-23R *in vitro*

Para el ensayo de bloqueo de la actividad de IL-23 se utilizaron cultivos primarios de bazo de ratones C57BL6/J de 8-10 y medio condicionado con sIL-23R procedente de un cultivo de células HEK-293QB infectadas con Ad5 sIL-23R.

Reactivos: medio de crecimiento (DMEM 10% FBS), medio de infección (DMEM 2% FBS, IL-23 (R&D Systems®, Minneapolis, MN, USA), Tampón de lisis RIPA: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0,25% deoxicolato sódico pH=7,4, tableta con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Roche®), anticuerpo primario anti-STAT3 (Cell Singaling Technology®, Danvers, MA, USA), anticuerpo primario anti-P-STAT3 (Cell Singaling Technologies®), anticuerpo primario anti-actina (Sigma-Aldrich®).

Procedimiento: En primer lugar, se prepara un medio condicionado con sIL-23R (y GFP como control). Se infecta un cultivo de $4,5 \times 10^7$ células HEK-293QB a una confluencia del 70% con Ad5 sIL-23R a una MOI de 10 y se incuba a 37°C y 5% de CO₂. Como control, se infecta un cultivo con Ad5 GFP. Trascorridas 28 horas, se recoge el sobrenadante, se centrifuga a 200g durante 5 minutos para precipitar los restos celulares y se congela a -80°C hasta el momento de su utilización.

Se prepara un cultivo primario de bazo tal y como se detalla en el apartado “2.4.3 Cultivos primarios de leucocitos de ratón o cultivos de esplenocitos” con 9×10^6 células por condición en medio de crecimiento (a una concentración de 6×10^6 células/mL) y se incuba durante 1 hora a 37°C y 5% de CO_2 . En paralelo, se añade IL-23 (o H_2O) a una concentración de 10 ng/mL al medio condicionado con sIL-23R (o con GFP) y se incuba durante 1 hora a 37°C . Se añade la misma cantidad de medio condicionado que de medio de cultivo al cultivo primario de bazo y se incuba a 37°C y 5% de CO_2 durante 5 minutos. Transcurrido ese tiempo, se recuperan las células y se centrifugan a 200g durante 5 minutos para eliminar el sobrenadante y se lisan con 100 μL de tampón de lisis RIPA.

Finalmente, se miran los niveles de fosforilación de STAT3 por western blot normalizando con la cantidad total de STAT3 y actina.

2.5. Vectores virales

Las producciones de vectores adenovirales y adenoasociados se han llevado a cabo en condiciones de bioseguridad de nivel 2 (NBS2) siguiendo el reglamento de seguridad de la UPV del Institut de Neurociències de la UAB . Los residuos generados durante este trabajo han sido eliminados siguiendo el procedimiento correspondiente al NBS2.

2.5.1. Generación y purificación de vectores adenoasociados

La producción de AAVs se ha llevado a cabo siguiendo el protocolo de la triple transfección (Xiao et al., 1998) en ausencia de adenovirus *helper* para generar una producción carente de adenovirus contaminantes. En el proceso de producción, cada plásmido guarda una función específica: pRep2CapX (donde X corresponde al pseudotipo de vector AAV a producir) codifica para las proteínas necesarias para 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

o pAAV CAG que contiene un *cassette* de expresión flanqueado por las secuencias ITR virales (señal de empaquetamiento del virus). En la producción de vectores pseudotipados, las ITRs y el gen *Rep* del AAV2 se mantienen cambiando únicamente el gen *Cap* del AAV2 por el de otro serotipo diferente. De esta manera se consigue un AAV pseudotipado con el tropismo cambiado.

2.5.1.1. Producción de vectores AAV por triple transfección

Reactivos: Medio de crecimiento: DMEM 10% FBS, Medio de transfección: DMEM 1% FBS, PEI (PolyScience®), NaCl 0,9% (B. Braun®), tampón de lisis (50 mM Tris, 20 mM NaCl, 2 mM MgCl₂).

Procedimiento: Se preparan 20 placas de 15 cm con células HEK-293AAV (4x10⁸ células) a una confluencia del 70% en el momento de la transfección. Se aspira el medio de crecimiento y añaden 12 ml de medio de transfección a cada placa. Se realiza la triple transfección con PEI. Se prepara la disolución del DNA utilizando 25 µg de pXX6, 12,5 µg de pRep2CapX y 12,5 µg del plásmido a encapsidar por placa en 1 mL de NaCl 0,9%. Por otro lado, se prepara el PEI a razón de 2,25 µL por cada µg de DNA disolviéndolo en 1 mL de NaCl 0,9% por placa. Se mezclan las dos disoluciones, se incuban durante 20 minutos a temperatura ambiente y se añaden 2 ml de mezcla a cada placa. Se reparte uniformemente y se incuba a 37°C y 5% de CO₂. Transcurridas 6 horas, se cambia el medio por medio de crecimiento fresco.

Cuarenta y ocho horas post-transfección, se recogen las células con la ayuda de un *scraper* y se centrifugan a 200g durante 5 minutos. Se separa el sobrenadante de las células para purificarlos por separado y el pellet celular se resuspende en 30 mL de tampón de lisis. Tanto el sobrenadante como el lisado células se almacenan a -80°C hasta el momento de la purificación.

2.5.1.2. Purificación por gradiente de densidad de iodixanol

El método de purificación utilizado basado en el fraccionamiento mediante un gradiente de densidad en un medio no iónico como el iodixanol, tiene la ventaja respecto a la purificación clásica con doble gradiente de cloruro de cesio de que las

partículas no se agregan y el iodixanol es inerte. Por lo tanto, este proceso no requiere una purificación posterior (Zolotukhin et al., 1999). El protocolo se basa en un primer paso de precipitación de las partículas virales seguido de un gradiente de iodixanol. En general, los vectores AAVs se liberan parcialmente de las células durante la producción y, por tanto, es necesario la purificación del sobrenadante y de las células por separado.

Reactivos: Benzonasa (Merk®), PBSMK (PBS 1x, 1 mM MgCl₂, 2,5 mM KCl), PBSMK-NaCl 1 M (PBS 1x, 1 mM MgCl₂, 2,5 mM KC, 1 M NaCl), iodixanol (StemCell Technology®, Vancouver, Canadá), phenol red (Sigma-Aldrich®), polietilenglicol 40% (PEG) (Fluka®), NaCl 5M, tampón de lisis (50 mM Tris, 20 mM NaCl, 2 mM MgCl₂).

Procedimiento: El primer lugar, se realizan tres ciclos de congelación-descongelación para lisar las células y se precipitan los restos celulares por centrifugación a 2000g durante 10 minutos. Se recupera el sobrenadante y se añade Benzonasa (50 U/mL) para degradar el DNA celular y se incuba 1 hora a 37°C. Posteriormente se centrifuga a 3000g durante 20 minutos y se añade PEG 40% (1 mL PEG/4 mL de lisado) y NaCl 5 M (30 µL/mL lisado) al sobrenadante para facilitar la precipitación de las partículas virales dejando actuar 3 horas a 4°C. Se centrifuga durante 15 minutos a 8000g a 4°C y se elimina el sobrenadante por decantación. Por último, se resuspende el pellet con 5 mL de tampón de lisis y se incuba 48 horas a 4°C.

Por otro lado, se añade PEG 40% (1 mL PEG/4 mL de lisado) y NaCl 5 M (30 µL/mL lisado) al sobrenadante de la producción para precipitar las proteínas y se incuba toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se centrifuga a 3000g durante 30 minutos a 4°C y se elimina el sobrenadante por decantación. Se resuspende el pellet con 5 mL de tampón de lisis, se añade la benzonasa (50 U/mL) y se incuba 1 hora a 37°C.

Finalmente, se mezclan los precipitados de las células (5 mL) y el sobrenadante (5 mL) y se purifican conjuntamente mediante un gradiente de iodixanol.

Preparación del gradiente de iodixanol: En primer lugar, se preparan las diferentes concentraciones de iodixanol que formarán las capas en el gradiente.

- Iodixanol 15% en PBSMK-NaCl
- Iodixanol 25% en PBSMK con 20 μ L de phenol red para proporcionar un color rojo.
- Iodixanol 40% en PBSMK
- Iodixanol 60% en PBSMK con 2 μ L de phenol red para proporcionar un color amarillo.

A continuación, se prepara el gradiente formando capas añadiendo en el fondo de manera muy lenta las soluciones de iodixanol de menos densa a más densa, atravesando las capas depositadas anteriormente y se añade la solución viral a purificar en la parte superior:

- 7,5 ml de Iodixanol 15%
- 5 ml de Iodixanol 25%
- 4 ml de Iodixanol 40%
- 4 ml de Iodixanol 60%
- 10 ml de Solución viral

Una vez montado el gradiente, se ultracentrifuga a 69000rpm en un rotor Beckman 70Ti durante 90 minutos a 18°C y se recogen las diferentes fracciones perforando el fondo del tubo.

2.5.2. Determinación del título de los vectores adenoasociados

La determinación del título de las preparaciones virales se realiza mediante la utilización de una molécula llamada *picogreen* que se intercala en las cadenas dsDNA permitiendo la cuantificación del número de genomas por fluorescencia. Este método fue puesto a punto por la 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 96 pocillos negra (Nunc®), fluorímetro (Wallac 1420 Victor³ TM) del Servicio de Análisis y

Fotodocumentación del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Biociencias de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Procedimiento: Se diluyen 2 µL de cada muestra con 8 µL de tampón TE y se añaden 10 µL de tampón de lisis. La lisis de las cápsides virales se realiza en un termociclador realizando un calentamiento de 1 hora a 70°C seguido de enfriamientos de 5°C cada minuto hasta llegar a una temperatura de 25°C. Una vez finalizado el programa del termociclador, se traspasan los 20 µL de cada muestra a un pocillo de una placa de 96 pozos negra y se añaden 180 µL de una dilución 1/40000 de picogreen en TE a cada pozo. Se incorporan, también, las muestras sin tampón de lisis para detectar el DNA exógeno presente en cada muestra. Además de las muestras a analizar, se realiza una recta patrón de 40, 13,33, 4,44, 1,48, 0,49, 0,16 y 0,12 ng de DNA en la que se lee la fluorescencia.

Se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente y se procede a la lectura de la fluorescencia con un fluorímetro. Finalmente, interpolando la fluorescencia obtenida de las muestras con la de la recta patrón de obtienen los ng de DNA presentes en cada muestra y con la siguiente fórmula se calculan los genomas virales de cada preparación:

$$\frac{A \times 1.82 \cdot 10^{12}}{B}$$

Donde A son los ng/ml de DNA: ng/mL= ng en pozo x 1000/ C,

B es la longitud del genoma del AAV (distancia en bases entre las ITR)

y C es el número de µL leídos

2.5.3. Generación y purificación de vectores adenovirales

El protocolo de producción de vectores adenovirales se basa en la introducción del DNA del adenovirus linealizado de manera que, una vez dentro, pueda iniciar su ciclo viral normal para generar nuevos virus. Así, tras una primera transfección a

pequeña escala, se genera un medio condicionado con virus que se utiliza para la amplificación viral. La fase de amplificación se basa en la infección de una placa de 10 cm con el objetivo de producir la cantidad de virus necesaria para la fase final de producción donde se infectan 4×10^8 células HEK-293QB. Tras la producción, se procede a la purificación mediante un doble gradiente de cloruro de cesio seguido de una cromatografía de exclusión molecular para sustituir el cloruro de cesio por una solución inerte.

Los genomas virales utilizados en este trabajo son genomas carentes del gen E1 y, por tanto, los vectores generados son defectivos para la replicación. Estos virus, se producen en células HEK-293 que contienen dicho gen incorporado en su genoma *in trans*, de manera que pueden replicarse en esta línea celular.

2.5.3.1. Preparación del genoma viral para su transfección en células HEK-293

Antes de proceder a la transfección, el plásmido del genoma adenoviral se linealiza mediante la digestión con la enzima de restricción *PacI* con el objetivo de eliminar el origen de replicación plasmídico y el gen de resistencia a la ampicilina. Para ello, se digieren 100 μ g de DNA con 50 U de *PacI* en un volumen final de 200 μ L. A continuación, se precipita con 0,1 volúmenes de acetato de potasio 3 M (pH=5,2) y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Se incuba a -80°C durante 30 minutos y se centrifuga a 16000g y a 4°C descartando el sobrenadante. Se lava el precipitado de DNA con etanol 70% y se deja secar a temperatura ambiente. Tras esto, se resuspende el DNA con agua MilliQ o TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH=8) y se incuba 1 hora a 37°C .

2.5.3.2. Transfección y amplificación de los vectores virales

La transfección de los vectores virales se lleva a cabo en células HEK-293QB en placa de 6 pocillos siguiendo el procedimiento descrito en el apartado “2.4.4 Introducción de DNA plasmídico en células por transfección”. Las 72 horas post transfección, se recogen las células y se realizan tres ciclos de

congelación/descongelación para liberar el virus. Se centrifuga a 2000g durante 5 minutos para precipitar los restos celulares y separar el sobrenadante.

El lisado crudo procedente de la placa de 6 pocillos se utiliza para infectar una placa de 10 cm al 70% de confluencia (6×10^6 células HEK-293QB). Pasados entre 5 y 15 días (variable en función del virus), cuando se observa efecto citopático visible porque las células dejan de estar adheridas a la placa, se recogen las células y se lisan mediante 3 ciclos de congelación/descongelación. Seguidamente, se centrifuga a 2000g durante 5 minutos para eliminar los restos celulares obteniendo, así el lisado crudo necesario para la fase final de producción.

Para la producción final, se infectan 4×10^8 células HEK-293QB en medio DMEM 2% FBS y se incuban a 37°C y 5% CO₂ durante 36 horas (tiempo óptimo para la producción del Ad5). Transcurrido ese tiempo, se recogen las células y se centrifugan a 200g durante 5 minutos resuspendiéndolas en 10 mL del medio de la producción. Se lisan las células mediante 3 ciclos de congelación/descongelación y, finalmente, se centrifuga a 2000g durante 5 minutos para eliminar los restos celulares obteniendo, así el lisado crudo a purificar.

2.5.3.3. Purificación de vectores adenovirales

Para la purificación de los adenovirus se realizan dos ultracentrifugaciones seriadas del lisado crudo en gradiente de CsCl. La primera centrifugación se realiza en un gradiente discontinuo mientras que para la segunda se utiliza un gradiente continuo. Para la preparación del primer gradiente se colocan 2,5 mL de CsCl a una concentración de 1,25 g/mL en un tubo de ultracentrifugación. Suavemente, se añaden 2,5 mL de CsCl a una concentración de 1,4 g/mL en el fondo del tubo atravesando la primera solución con la pipeta. Por último, se añade el lisado crudo en la parte superior del gradiente hasta rellenar por completo el tubo de centrifugación. La centrifugación se realiza con el rotor Beckman SW32 durante 1 hora y 42 minutos a 32000rpm y 18°C. Tras la centrifugación, se observa una banda opaca entre las dos fases del gradiente correspondiente a las partículas virales. Utilizando una aguja hipodérmica, se perfora el tubo por un lateral y se extraen las

partículas virales. Para la segunda centrifugación, se añaden 5 mL de CsCl a 1,34 g/mL en un tubo y se deposita la muestra procedente del primer gradiente lentamente encima. Se centrifuga en un rotor Beckman SW40 durante 18 horas a 35000rpm y 18 °C. Gracias a esta centrifugación, se separan las partículas virales de las partículas vacías que aparecen a una densidad menor. Con la ayuda de una aguja hipodérmica, se extrae la banda correspondiente a las partículas virales y se procede a eliminar el CsCl (es tóxico para las células) con una columna Sephadex PD-10 (Amersham Bioscience®) sustituyéndolo por PBS. Se recogen varias fracciones procedentes de la columna, se les añade 10% de glicerol como crioprotector y se almacenan a -80°C hasta su titulación.

2.5.4. Titulación de vectores adenovirales

La titulación de la infectividad de los vectores adenovirales (IU/mL) le lleva a cabo en células HEK-293QB por dilución límite desde 10^{-3} hasta 10^{-10} en placa de 96 pozos realizando triplicados y se revela el resultado por tinción celular utilizando el *AdEasy™ Viral Titer kit* (Stratagene®, Santa Clara, CA, USA) siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante.

Para la titulación de las partículas físicas (PP/mL) se realiza una dilución de una alícuota de la producción en tampón de lisis Ad (Tris-HCl 0,1% SDS) y se calienta la muestra a 55°C durante 30 minutos. Seguidamente, se mide la absorbancia a 260nm y se calcula el título con la siguiente fórmula:

$$\text{Título (PP/ml)} = \text{Abs}_{260\text{nm}} \times \text{Factor de Dilución} \times 2,12 \times 10^{12}$$

2.5.5. Infección de células con vectores virales

Reactivos: medio de infección (medio de cultivo habitual con 2% de FBS)

Procedimiento: Se siembran células de manera que se encuentren a una confluencia entre el 70 y el 90% en el momento de la infección para optimizar el acceso de los vectores a las células. Se substituye el medio de crecimiento por medio de infección y se añade el volumen de virus correspondiente. El cálculo

depende de las partículas físicas o genomas virales por célula (PP/célula o vg/célula) o de las unidades infecciosas por célula (IU/célula), más conocido como MOI, con el que se desee infectar las células.

2.6. Estudios *in vivo* con ratones EAE

Para la realización de los experimentos con el modelo de EAE se utilizaron ratones hembra de la cepa C57BL6/J (Harlan, Italia) de entre 6-10 semanas de edad.

2.6.1. Inducción de la EAE en ratones y seguimiento clínico

Reactivos: ketamina (Pfizer®, Neww York, NY, USA), xilacina (Bayer®, Leverkusen, Alemania), péptido MOG₄₀₋₅₅ (sintetizado por la Secció de Proteómic, Serveis Cientificotècnics de la Universitat Pompeu Fabra), Adyuvante Incompleto Freund (IFA) (Sigma-Aldrich®), *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (BD®, Franklin lakes, NJ, USA), Toxina pertussis (Sigma-Aldrich®)

Inmunización: Los animales se anestesian con ketamina/xilacina (37/5,5 mg/kg) mediante administración intraperitoneal. Se preparan 200 µg del péptido MOG₄₀₋₅₅ diluido en suero salino. Seguidamente, se emulsiona con el Adyuvante Incompleto Freund suplementado con 4 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA. A cada ratón se le administran 200 µL totales de la emulsión repartidos en cuatro áreas próximas a los ganglios linfáticos axilares e inguinales. Además, en el momento de la inmunización y tras 48 horas de la misma, se administra por la vía intravenosa (vena lateral de la cola) 500 ng de toxina pertussis diluida en suero salino en un volumen de 200 µL por animal. Los ratones control del proceso de inmunización sufren el mismo proceso en ausencia de MOG₄₀₋₅₅ (animales inmunizados con suero fisiológico).

Tras la inmunización, los animales se pesan y evalúan clínicamente a diario de forma ciega, desde el día XX pi hasta el final del experimento. Para la evaluación de los síntomas clínicos se siguió la siguiente escala:

0: No clínica. El ratón anda correctamente y levanta la cola al caminar sobre la superficie de poliestireno, no cuele las patas sobre la rejilla y tiene tono en la totalidad de la cola.

0,5: Paresia parcial de la cola. El ratón tiene afectación o parálisis de la mitad distal de la cola.

1: Paresia total de la cola. El ratón tiene afectación o parálisis de la cola.

2: Paraparesia. El ratón tiene afectación (leve, moderada o grave) de las patas traseras. No se debe observar parálisis total (paraplejia) de las patas traseras.

3: Paraplejia. El ratón arrastra las patas traseras, parálisis total de las patas traseras.

4: Tetraparesia. El ratón tiene afectación (leve, moderada o grave) de las patas traseras y delanteras.

5: Tetraplejia, moribundo. El ratón no es capaz de moverse.

6: Éxitus. Muerte del ratón.

Para garantizar el bienestar animal se pondrán pellets de comida húmedos en el lecho cuando los animales empiecen a desarrollar los signos clínicos para facilitarles el acceso al alimento, así como la hidratación. Se administrará de forma subcutánea 0,5 ml de suero glucosado al 10% en caso de pérdida de peso superior al 15%. Si la pérdida de peso excede el 30% o un animal alcanza la puntuación clínica de 5 el animal será eutanasiado.

2.6.2. Obtención y fijación del SNC

Reactivos: Paraformaldehido 4%, PBS, Sacarosa 30%, O.C.T. (Sakura®, Alphen aan den Rijn, Holanda)

La médula espinal se extrae y se mantiene en paraformaldehido al 4% durante 48 horas a 4°C. A continuación, se realizan 5-7 lavados con PBS y se sumergen en una solución de sacarosa al 30% a 4°C. En un primer momento, los tejidos flotan en la solución de sacarosa y se mantienen en ella hasta que el tejido se hunde completamente situándose en el fondo del tubo indicando que ha absorbido toda la sacarosa necesaria (actuará como crioprotector). Posteriormente, se incluyen los tejidos en O.C.T. y se congelan en nitrógeno líquido. Temporalmente se conservan congelados a -20°C. Más adelante, se cortan con el criostato y se montan

en el portaobjetos conservándose congeladas a -20°C hasta el momento de su utilización.

2.6.3. Estudios histopatológicos

2.6.3.1. Hematoxilina-eosina (HE)

Partiendo de las muestras de médulas espinales en los portaobjetos, se deshidratan con diluciones decrecientes de etanol y se sumergen en solución de hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich®) durante 5 minutos. A continuación, se realiza el viraje en agua corriente durante 4 minutos. Seguidamente, las muestras se sumergen en eosina alcohólica durante 30 segundos y se realizan lavados con diluciones ascendentes de etanol. Finalmente, se aclaran con xilol y se montan con DPX.

2.6.3.2. Klüver-Barrera (KB)

La técnica de Klüver-Barrera utiliza dos colorantes: el violeta de cresilo (tinción de Nissl) y el luxol fast blue (afinidad por los lípidos de la vaina de mielina). Una vez realizado el proceso de deshidratación con diluciones decrecientes de etanol, se tiñen las muestras con solución luxol fast blue al 0,1% O/N a 55°C. Posteriormente, se realiza la diferenciación utilizando alcohol al 95% y carbonato de litio al 0,05%. A continuación, se realiza la contratinción con solución de violeta de cresilo al 0,1% durante 5 minutos a 55°C. Finalmente, se realizan un lavado en alcohol al 95%, se aclara con xilol y se realiza el montaje con DPX.

2.6.3.3. Análisis histológico

Las diferentes tinciones tanto de hematoxilina-eosina como de Klüver-Barrera fueron analizadas en ciego por el doctor Joan Francisco Espinosa siguiendo la siguiente escala:

0. Estado normal del tejido

1. Una o pocas áreas de infiltración. Menos del 5% de la sustancia blanca afectada.

2. Varias áreas afectadas con un área de afectación entre el 5 y el 20%.
3. Áreas de afectación de tamaño medio. Área afectada entre 20 y el 40%.
4. Grandes áreas de afectación. Área afectada 40-60%. Desestructuración tisular.
5. Tejido completamente desestructurado con un área de afectación >60%.

2.6.4. Ensayos de proliferación celular

Reactivos: medio de proliferación (IMDM suplementado con 10% FCS Gold, 2 mM de L-glutamina, 50 UI/mL de penicilina, 50 µg/ml de streptomina, 50 µM de 2-mercaptoetanol), 5 µg/ml de péptido MOG₄₀₋₅₅, Fitohemaglutinina (PHA) (Sigma-Aldrich®), [³H]-timidina (PerkinElmer®, Waltham, MA, USA).

Procedimiento: Se extraen los bazos de los animales una vez eutanasiados y se purifican los esplenocitos (como se detalla anteriormente). A continuación, se siembran en medio de proliferación y se incuban con MOG₄₀₋₅₅ a 37°C y al 5% de CO₂. Los controles negativos fueron esplenocitos cultivados en ausencia de MOG₄₀₋₅₅, mientras que los controles positivos fueron esplenocitos cultivados con 5 µg/ml de PHA. Transcurridas 48 horas, se añade 1 µCi/pocillo de [³H]-timidina y, tras 18 horas, se miden los niveles de incorporación de radioactividad de 5 réplicas por ratón y condición, con un contador beta de centelleo.

2.6.5. Análisis estadístico

Las diferencias entre grupos se analizaron bien por T-student o bien por ANOVA con un test post-hoc de Tukey. En aquellas muestras no paramétricas se realizó un test Kruskal-Wallis con un post-hoc de Games-Howell. En todos los casos se consideraron diferencias estadísticamente significativas valores de $p < 0.05$.

BIBLIOGRAFÍA

- Afione, S. A., Conrad, C. K., Kearns, W. G., Chunduru, S., Adams, R., Reynolds, T. C., ... Flotte, T. R. (1996). In vivo model of adeno-associated virus vector persistence and rescue. *Journal of Virology*, *70*(5), 3235–3241.
- Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.-H., de Sauvage, F. J., & Gurney, A. L. (2003). Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(3), 1910–1914. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207577200>
- Akache, B., Grimm, D., Pandey, K., Yant, S. R., Xu, H., & Kay, M. A. (2006). The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9. *Journal of Virology*, *80*(19), 9831–9836. <https://doi.org/10.1128/JVI.00878-06>
- Alderson, M. R., Tough, T. W., Ziegler, S. F., & Grabstein, K. H. (1991). Interleukin 7 induces cytokine secretion and tumoricidal activity by human peripheral blood monocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, *173*(4), 923–930.
- Alfonso-Cristancho, R., Armstrong, N., Arjunji, R., Riemsma, R., Worthy, G., Ganguly, R., & Kleijnen, J. (2017). Comparative effectiveness of biologics for the management of rheumatoid arthritis: systematic review and network meta-analysis. *Clinical Rheumatology*, *36*(1), 25–34. <https://doi.org/10.1007/s10067-016-3435-2>
- Almohmeed, Y. H., Avenell, A., Aucott, L., & Vickers, M. A. (2013). Systematic review and meta-analysis of the sero-epidemiological association between Epstein Barr virus and multiple sclerosis. *PloS One*, *8*(4), e61110. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061110>
- Amadi-Obi, A., Yu, C.-R., Liu, X., Mahdi, R. M., Clarke, G. L., Nussenblatt, R. B., ... Egwuagu, C. E. (2007). TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nature Medicine*, *13*(6), 711–718. <https://doi.org/10.1038/nm1585>
- Ambrosi, A., Espinosa, A., & Wahren-Herlenius, M. (2012). IL-17: a new actor in IFN-driven systemic autoimmune diseases. *European Journal of Immunology*, *42*(9), 2274–2284. <https://doi.org/10.1002/eji.201242653>
- Arbelaez, C. A., Glatigny, S., Duhon, R., Eberl, G., Oukka, M., & Bettelli, E. (2015). IL-7/IL-7 Receptor Signaling Differentially Affects Effector CD4+ T Cell Subsets Involved in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *195*(5), 1974–1983. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403135>
- Argos, P. (1990). An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion. *Journal of Molecular Biology*, *211*(4), 943–958. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90085-Z](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90085-Z)

- Arima, Y., Harada, M., Kamimura, D., Park, J.-H., Kawano, F., Yull, F. E., ... Murakami, M. (2012). Regional neural activation defines a gateway for autoreactive T cells to cross the blood-brain barrier. *Cell*, *148*(3), 447–457. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.022>
- Ascherio, A., & Munger, K. L. (2007). Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Annals of Neurology*, *61*(4), 288–299. <https://doi.org/10.1002/ana.21117>
- Ascherio, A., Munger, K. L., White, R., Kochert, K., Simon, K. C., Polman, C. H., ... Pohl, C. (2014). Vitamin D as an early predictor of multiple sclerosis activity and progression. *JAMA Neurology*, *71*(3), 306–314. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.5993>
- Ashbaugh, J. J., Brambilla, R., Karmally, S. A., Cabello, C., Malek, T. R., & Bethea, J. R. (2013). IL7Ralpha contributes to experimental autoimmune encephalomyelitis through altered T cell responses and nonhematopoietic cell lineages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *190*(9), 4525–4534. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203214>
- Asokan, A., Hamra, J. B., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M., & Samulski, R. J. (2006). Adeno-associated virus type 2 contains an integrin alpha5beta1 binding domain essential for viral cell entry. *Journal of Virology*, *80*(18), 8961–8969. <https://doi.org/10.1128/JVI.00843-06>
- Atchinson, R. W., Casto, B. C., & Hammon, W. M. (1965). ADENOVIRUS-ASSOCIATED DEFECTIVE VIRUS PARTICLES. *Science (New York, N.Y.)*, *149*(3685), 754–756.
- Balandina, A., Lecart, S., Dartevelle, P., Saoudi, A., & Berrih-Aknin, S. (2005). Functional defect of regulatory CD4(+)CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. *Blood*, *105*(2), 735–741. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-11-3900>
- Barron, L., Doms, H., Hoyer, K. K., Kuswanto, W., Hofmann, J., O’Gorman, W. E., & Abbas, A. K. (2010). Cutting edge: mechanisms of IL-2-dependent maintenance of functional regulatory T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *185*(11), 6426–6430. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903940>
- Bartosik-Psujek, H., & Stelmasiak, Z. (2005). The levels of chemokines CXCL8, CCL2 and CCL5 in multiple sclerosis patients are linked to the activity of the disease. *European Journal of Neurology*, *12*(1), 49–54. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2004.00951.x>
- Baxter, A. G. (2007). The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature Reviews. Immunology*, *7*(11), 904–912. <https://doi.org/10.1038/nri2190>
- Belbasis, L., Bellou, V., Evangelou, E., Ioannidis, J. P. A., & Tzoulaki, I. (2015). Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *The Lancet. Neurology*, *14*(3), 263–273. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70267-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70267-4)
- Ben-Ami Shor, D., Harel, M., Eliakim, R., & Shoenfeld, Y. (2013). The hygiene theory harnessing

- helminths and their ova to treat autoimmunity. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 45(2), 211–216. <https://doi.org/10.1007/s12016-012-8352-9>
- Berns, K. I., & Adler, S. (1972). Separation of two types of adeno-associated virus particles containing complementary polynucleotide chains. *Journal of Virology*, 9(2), 394–396.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., ... Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441(7090), 235–238. <https://doi.org/10.1038/nature04753>
- Bielekova, B., Muraro, P. A., Golestaneh, L., Pascal, J., McFarland, H. F., & Martin, R. (1999). Preferential expansion of autoreactive T lymphocytes from the memory T-cell pool by IL-7. *Journal of Neuroimmunology*, 100(1–2), 115–123. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(99\)00200-3](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(99)00200-3)
- Billiau, A., Heremans, H., Vandekerckhove, F., Dijkmans, R., Sobis, H., Meulepas, E., & Carton, H. (1988). Enhancement of experimental allergic encephalomyelitis in mice by antibodies against IFN-gamma. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 140(5), 1506–1510.
- Blackburn, S. D., Steadman, R. A., & Johnson, F. B. (2006). Attachment of adeno-associated virus type 3H to fibroblast growth factor receptor 1. *Archives of Virology*, 151(3), 617–623. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0650-6>
- Blakemore, W. F., & Franklin, R. J. M. (2008). Remyelination in experimental models of toxin-induced demyelination. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 318, 193–212.
- Bock, G. H., Long, C. A., Riley, M. L., White, J. D., Kurman, C. C., Fleisher, T. A., ... Schwietermann, W. D. (1993). Characterization of a new IL-6-dependent human B-lymphoma cell line in long term culture. *Cytokine*, 5(5), 480–489. [https://doi.org/10.1016/1043-4666\(93\)90039-8](https://doi.org/10.1016/1043-4666(93)90039-8)
- Bray, P. F., Luka, J., Bray, P. F., Culp, K. W., & Schlicht, J. P. (1992). Antibodies against Epstein-Barr nuclear antigen (EBNA) in multiple sclerosis CSF, and two pentapeptide sequence identities between EBNA and myelin basic protein. *Neurology*, 42(9), 1798–1804.
- Breuer, J., Schwab, N., Schneider-Hohendorf, T., Marziniak, M., Mohan, H., Bhatia, U., ... Wiendl, H. (2014). Ultraviolet B light attenuates the systemic immune response in central nervous system autoimmunity. *Annals of Neurology*, 75(5), 739–758. <https://doi.org/10.1002/ana.24165>
- Calabrese, M., Magliozzi, R., Ciccarelli, O., Geurts, J. J. G., Reynolds, R., & Martin, R. (2015). Exploring the origins of grey matter damage in multiple sclerosis. *Nature Reviews. Neuroscience*, 16(3), 147–158. <https://doi.org/10.1038/nrn3900>
- Calabresi, P. A., Giovannoni, G., Confavreux, C., Galetta, S. L., Havrdova, E., Hutchinson, M., ... Panzara,

- M. A. (2007). The incidence and significance of anti-natalizumab antibodies: results from AFFIRM and SENTINEL. *Neurology*, 69(14), 1391–1403. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000277457.17420.b5>
- Cassinotti, P., Weitzand, M., & Tratschin, J. D. (1988). Organization of the adeno-associated virus (AAV) capsid gene: mapping of a minor spliced mRNA coding for virus capsid protein. *Virology*, 167(1), 176–184.
- Chard, D., & Miller, D. (2009). Grey matter pathology in clinically early multiple sclerosis: evidence from magnetic resonance imaging. *Journal of the Neurological Sciences*, 282(1–2), 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2009.01.012>
- Charles, P., Tait, S., Faivre-Sarrailh, C., Barbin, G., Gunn-Moore, F., Denisenko-Nehrbass, N., ... Lubetzki, C. (2002). Neurofascin is a glial receptor for the paranodin/Caspr-contactin axonal complex at the axoglial junction. *Current Biology : CB*, 12(3), 217–220.
- Chen, G. Q., Chen, Y. Y., Wang, X. S., Wu, S. Z., Yang, H. M., Xu, H. Q., ... Zheng, R. Y. (2010). Chronic caffeine treatment attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis induced by guinea pig spinal cord homogenates in Wistar rats. *Brain Research*, 1309, 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.10.054>
- Chen, X., Zaro, J. L., & Shen, W.-C. (2013). Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(10), 1357–1369. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.039>
- Chen, Y., Langrish, C. L., McKenzie, B., Joyce-Shaikh, B., Stumhofer, J. S., McClanahan, T., ... Cua, D. J. (2006). Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(5), 1317–1326. <https://doi.org/10.1172/JCI25308>
- Cheung, A. K., Hoggan, M. D., Hauswirth, W. W., & Berns, K. I. (1980). Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human Detroit 6 cells. *Journal of Virology*, 33(2), 739–748.
- Chi, L.-J., Wang, H.-B., Zhang, Y., & Wang, W.-Z. (2007). Abnormality of circulating CD4(+)CD25(+) regulatory T cell in patients with Guillain-Barre syndrome. *Journal of Neuroimmunology*, 192(1–2), 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2007.09.034>
- Codarri, L., Gyulveszi, G., Tosevski, V., Hesske, L., Fontana, A., Magnenat, L., ... Becher, B. (2011). ROR γ drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nature Immunology*, 12(6), 560–567. <https://doi.org/10.1038/ni.2027>

- Coles, A. J., Cohen, J. A., Fox, E. J., Giovannoni, G., Hartung, H.-P., Havrdova, E., ... Arnold, D. L. (2017). Alemtuzumab CARE-MS II 5-year follow-up: Efficacy and safety findings. *Neurology*, *89*(11), 1117–1126. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004354>
- Collison, L. W., Chaturvedi, V., Henderson, A. L., Giacomini, P. R., Guy, C., Bankoti, J., ... Vignali, D. A. A. (2010). IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nature Immunology*, *11*(12), 1093–1101. <https://doi.org/10.1038/ni.1952>
- Compston, A., & Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet (London, England)*, *372*(9648), 1502–1517. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61620-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61620-7)
- Consortium, I. M. S. G. (2019). A systems biology approach uncovers cell-specific gene regulatory effects of genetic associations in multiple sclerosis. *Nature Communications*, *10*(1), 2236. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09773-y>
- Constantinescu, C. S., Wysocka, M., Hilliard, B., Ventura, E. S., Lavi, E., Trinchieri, G., & Rostami, A. (1998). Antibodies against IL-12 prevent superantigen-induced and spontaneous relapses of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *161*(9), 5097–5104.
- Cote, S., Matte, J., Sad, S., Angel, J. B., & Crawley, A. M. (2015). Complexed soluble IL-7 receptor alpha and IL-7 increase IL-7-mediated proliferation and viability of CD8(+) T-cells in vitro. *Cellular Immunology*, *293*(2), 122–125. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.01.001>
- Coura, R. dos S., & Nardi, N. B. (2007). The state of the art of adeno-associated virus-based vectors in gene therapy. *Virology Journal*, *4*, 99. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-4-99>
- Crawley, A. M., Faucher, S., & Angel, J. B. (2010). Soluble IL-7R alpha (sCD127) inhibits IL-7 activity and is increased in HIV infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *184*(9), 4679–4687. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903758>
- Cua, D. J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C. A., Joyce, B., Seymour, B., ... Sedgwick, J. D. (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, *421*(6924), 744–748. <https://doi.org/10.1038/nature01355>
- Dargahi, N., Katsara, M., Tselios, T., Androutsou, M.-E., de Courten, M., Matsoukas, J., & Apostolopoulos, V. (2017). Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update. *Brain Sciences*, *7*(7). <https://doi.org/10.3390/brainsci7070078>
- de Graaf, K. L., Weissert, R., Kjellen, P., Holmdahl, R., & Olsson, T. (1999). Allelic variations in rat MHC class II binding of myelin basic protein peptides correlate with encephalitogenicity. *International Immunology*, *11*(12), 1981–1988.

- Dendrou, C. A., Fugger, L., & Friese, M. A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews. Immunology*, *15*(9), 545–558. <https://doi.org/10.1038/nri3871>
- Derfuss, T., Parikh, K., Velhin, S., Braun, M., Mathey, E., Krumbholz, M., ... Meinl, E. (2009). Contactin-2/TAG-1-directed autoimmunity is identified in multiple sclerosis patients and mediates gray matter pathology in animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(20), 8302–8307. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901496106>
- Dexter, T. M., Garland, J., Scott, D., Scolnick, E., & Metcalf, D. (1980). Growth of factor-dependent hemopoietic precursor cell lines. *The Journal of Experimental Medicine*, *152*(4), 1036–1047. <https://doi.org/10.1084/jem.152.4.1036>
- Di Pasquale, G., Davidson, B. L., Stein, C. S., Martins, I., Scudiero, D., Monks, A., & Chiorini, J. A. (2003). Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction. *Nature Medicine*, *9*(10), 1306–1312. <https://doi.org/10.1038/nm929>
- Disanto, G., Morahan, J. M., Barnett, M. H., Giovannoni, G., & Ramagopalan, S. V. (2012). The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. *Neurology*, *78*(11), 823–832. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318249f6f0>
- Dong, J. Y., Fan, P. D., & Frizzell, R. A. (1996). Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Human Gene Therapy*, *7*(17), 2101–2112. <https://doi.org/10.1089/hum.1996.7.17-2101>
- Dooms, H., Kahn, E., Knoechel, B., & Abbas, A. K. (2004). IL-2 induces a competitive survival advantage in T lymphocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *172*(10), 5973–5979.
- Dumont, J. A., Low, S. C., Peters, R. T., & Bitonti, A. J. (2006). Monomeric Fc fusions: impact on pharmacokinetic and biological activity of protein therapeutics. *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*, *20*(3), 151–160. <https://doi.org/10.2165/00063030-200620030-00002>
- Einstein, E. R., Robertson, D. M., Dicaprio, J. M., & Moore, W. (1962). The isolation from bovine spinal cord of a homogeneous protein with encephalitogenic activity. *Journal of Neurochemistry*, *9*, 353–361.
- Engelhardt, B., & Briskin, M. J. (2005). Therapeutic targeting of alpha 4-integrins in chronic inflammatory diseases: tipping the scales of risk towards benefit? *European Journal of Immunology*, *35*(8), 2268–2273. <https://doi.org/10.1002/eji.200535195>
- Fagnani, C., Neale, M. C., Nistico, L., Stazi, M. A., Ricigliano, V. A., Buscarinu, M. C., ... Ristori, G. (2015). Twin studies in multiple sclerosis: A meta-estimation of heritability and environmentality.

- Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 21(11), 1404–1413.
<https://doi.org/10.1177/1352458514564492>
- Farez, M. F., & Correale, J. (2011). Immunizations and risk of multiple sclerosis: systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology*, 258(7), 1197–1206.
<https://doi.org/10.1007/s00415-011-5984-2>
- Farez, M. F., Fiol, M. P., Gaitan, M. I., Quintana, F. J., & Correale, J. (2015). Sodium intake is associated with increased disease activity in multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 86(1), 26–31. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-307928>
- Ferguson, B., Matyszak, M. K., Esiri, M. M., & Perry, V. H. (1997). Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain : A Journal of Neurology*, 120 (Pt 3), 393–399.
- Fernandez, O., Luque, G., San Roman, C., Bravo, M., & Dean, G. (1994). The prevalence of multiple sclerosis in the Sanitary District of Velez-Malaga, southern Spain. *Neurology*, 44(3 Pt 1), 425–429.
- Festa, E. D., Hankiewicz, K., Kim, S., Skurnick, J., Wolansky, L. J., Cook, S. D., & Cadavid, D. (2009). Serum levels of CXCL13 are elevated in active multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 15(11), 1271–1279.
<https://doi.org/10.1177/1352458509107017>
- Fleming, J. O., Isaak, A., Lee, J. E., Luzzio, C. C., Carrithers, M. D., Cook, T. D., ... Fabry, Z. (2011). Probiotic helminth administration in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 1 study. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 17(6), 743–754.
<https://doi.org/10.1177/1352458511398054>
- Fletcher, J. M., Lalor, S. J., Sweeney, C. M., Tubridy, N., & Mills, K. H. G. (2010). T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical and Experimental Immunology*, 162(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04143.x>
- Fletcher, J. M., Loneragan, R., Costelloe, L., Kinsella, K., Moran, B., O'Farrelly, C., ... Mills, K. H. G. (2009). CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 183(11), 7602–7610.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901881>
- Floss, D. M., Mrotzek, S., Klocker, T., Schroder, J., Grotzinger, J., Rose-John, S., & Scheller, J. (2013). Identification of canonical tyrosine-dependent and non-canonical tyrosine-independent STAT3 activation sites in the intracellular domain of the interleukin 23 receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(27), 19386–19400. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.432153>
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and

- function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology*, 4(4), 330–336.
<https://doi.org/10.1038/ni904>
- Friedmann, T., & Roblin, R. (1972). Gene therapy for human genetic disease? *Science (New York, N.Y.)*, 175(4025), 949–955.
- Friese, M. A., Montalban, X., Willcox, N., Bell, J. I., Martin, R., & Fugger, L. (2006). The value of animal models for drug development in multiple sclerosis. *Brain : A Journal of Neurology*, 129(Pt 8), 1940–1952. <https://doi.org/10.1093/brain/awl083>
- Friese, M. A., Schattling, B., & Fugger, L. (2014). Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nature Reviews. Neurology*, 10(4), 225–238.
<https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.37>
- Frischer, J. M., Bramow, S., Dal-Bianco, A., Lucchinetti, C. F., Rauschka, H., Schmidbauer, M., ... Lassmann, H. (2009). The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain : A Journal of Neurology*, 132(Pt 5), 1175–1189.
<https://doi.org/10.1093/brain/awp070>
- Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., ... Fujiyama, Y. (2003). Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*, 52(1), 65–70.
- Gaffen, S. L. (2008). An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine*, 43(3), 402–407.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.07.017>
- Georg-Fries, B., Biederlack, S., Wolf, J., & zur Hausen, H. (1984). Analysis of proteins, helper dependence, and seroepidemiology of a new human parvovirus. *Virology*, 134(1), 64–71.
- Ghalie, R. G., Edan, G., Laurent, M., Mauch, E., Eisenman, S., Hartung, H. P., ... Goodkin, D. E. (2002). Cardiac adverse effects associated with mitoxantrone (Novantrone) therapy in patients with MS. *Neurology*, 59(6), 909–913. <https://doi.org/10.1212/wnl.59.6.909>
- Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.-P., Tato, C. M., McGeachy, M. J., Konkel, J. E., ... O’Shea, J. J. (2010). Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature*, 467(7318), 967–971. <https://doi.org/10.1038/nature09447>
- Giri, J. G., Wells, J., Dower, S. K., McCall, C. E., Guzman, R. N., Slack, J., ... Sims, J. E. (1994). Elevated levels of shed type II IL-1 receptor in sepsis. Potential role for type II receptor in regulation of IL-1 responses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 153(12), 5802–5809.
- Goodwin, R. G., Friend, D., Ziegler, S. F., Jerzy, R., Falk, B. A., Gimpel, S., ... Namen, A. E. (1990). Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. *Cell*, 60(6), 941–951.

- Gracey, E., Qaiyum, Z., Almaghlouth, I., Lawson, D., Karki, S., Avvaru, N., ... Inman, R. D. (2016). IL-7 primes IL-17 in mucosal-associated invariant T (MAIT) cells, which contribute to the Th17-axis in ankylosing spondylitis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 75(12), 2124–2132. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-208902>
- Gregori, S., Casorati, M., Amuchastegui, S., Smiroldo, S., Davalli, A. M., & Adorini, L. (2001). Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(4), 1945–1953.
- Gregory, S. G., Schmidt, S., Seth, P., Oksenberg, J. R., Hart, J., Prokop, A., ... Haines, J. L. (2007). Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nature Genetics*, 39(9), 1083–1091. <https://doi.org/10.1038/ng2103>
- Gruden-Movsesijan, A., Ilic, N., Mostarica-Stojkovic, M., Stosic-Grujicic, S., Milic, M., & Sofronic-Milosavljevic, L. (2010). Mechanisms of modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by chronic *Trichinella spiralis* infection in Dark Agouti rats. *Parasite Immunology*, 32(6), 450–459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2010.01207.x>
- Guimond, M., Veenstra, R. G., Grindler, D. J., Zhang, H., Cui, Y., Murphy, R. D., ... Mackall, C. L. (2009). Interleukin 7 signaling in dendritic cells regulates the homeostatic proliferation and niche size of CD4+ T cells. *Nature Immunology*, 10(2), 149–157. <https://doi.org/10.1038/ni.1695>
- Guo, W., Luo, C., Wang, C., Wang, Y. H., Wang, X., Gao, X. D., & Yao, W. B. (2014). Suppression of human and mouse Th17 differentiation and autoimmunity by an endogenous Interleukin 23 receptor cytokine-binding homology region. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 55, 304–310. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.09.019>
- Guo, W., Luo, C., Wang, C., Zhu, Y., Wang, X., Gao, X., & Yao, W. (2012). Protection against Th17 cells differentiation by an interleukin-23 receptor cytokine-binding homology region. *PloS One*, 7(9), e45625. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045625>
- Haines, J. L., Ter-Minassian, M., Bazyk, A., Gusella, J. F., Kim, D. J., Terwedow, H., ... Oksenberg, J. R. (1996). A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatibility complex. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Nature Genetics*, 13(4), 469–471. <https://doi.org/10.1038/ng0896-469>
- Handa, A., Muramatsu, S., Qiu, J., Mizukami, H., & Brown, K. E. (2000). Adeno-associated virus (AAV)-3-based vectors transduce haematopoietic cells not susceptible to transduction with AAV-2-based vectors. *The Journal of General Virology*, 81(Pt 8), 2077–2084. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-8-2077>
- Handel, A. E., Williamson, A. J., Disanto, G., Dobson, R., Giovannoni, G., & Ramagopalan, S. V. (2011).

- Smoking and multiple sclerosis: an updated meta-analysis. *PLoS One*, 6(1), e16149. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016149>
- Handel, A. E., Williamson, A. J., Disanto, G., Handunnetthi, L., Giovannoni, G., & Ramagopalan, S. V. (2010). An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLoS One*, 5(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012496>
- Hara, T., Shitara, S., Imai, K., Miyachi, H., Kitano, S., Yao, H., ... Ikuta, K. (2012). Identification of IL-7-producing cells in primary and secondary lymphoid organs using IL-7-GFP knock-in mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 189(4), 1577–1584. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200586>
- Harkioliaki, M., Holmes, S. L., Svendsen, P., Gregersen, J. W., Jensen, L. T., McMahon, R., ... Fugger, L. (2009). T cell-mediated autoimmune disease due to low-affinity crossreactivity to common microbial peptides. *Immunity*, 30(3), 348–357. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.01.009>
- Hartigan-O'Connor, D. J., Poon, C., Sinclair, E., & McCune, J. M. (2007). Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *Journal of Immunological Methods*, 319(1–2), 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.10.008>
- Hartmann, F. J., Khademi, M., Aram, J., Ammann, S., Kockum, I., Constantinescu, C., ... Becher, B. (2014). Multiple sclerosis-associated IL2RA polymorphism controls GM-CSF production in human TH cells. *Nature Communications*, 5, 5056. <https://doi.org/10.1038/ncomms6056>
- Hauser, S. L., Waubant, E., Arnold, D. L., Vollmer, T., Antel, J., Fox, R. J., ... Smith, C. H. (2008). B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 358(7), 676–688. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0706383>
- Hawkes, C. H., & Macgregor, A. J. (2009). Twin studies and the heritability of MS: a conclusion. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 15(6), 661–667. <https://doi.org/10.1177/1352458509104592>
- He, Z., Jin, L., Liu, Z.-F., Hu, L., Dang, E.-L., Feng, Z.-Z., ... Wang, G. (2012). Elevated serum levels of interleukin 21 are associated with disease severity in patients with psoriasis. *The British Journal of Dermatology*, 167(1), 191–193. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.10899.x>
- Hedstrom, A. K., Lima Bomfim, I., Barcellos, L., Gianfrancesco, M., Schaefer, C., Kockum, I., ... Alfredsson, L. (2014). Interaction between adolescent obesity and HLA risk genes in the etiology of multiple sclerosis. *Neurology*, 82(10), 865–872. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000203>

- Hedstrom, A. K., Mowry, E. M., Gianfrancesco, M. A., Shao, X., Schaefer, C. A., Shen, L., ... Alfredsson, L. (2016). High consumption of coffee is associated with decreased multiple sclerosis risk; results from two independent studies. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *87*(5), 454–460. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2015-312176>
- Hedstrom, K. L., Xu, X., Ogawa, Y., Frischknecht, R., Seidenbecher, C. I., Shrager, P., & Rasband, M. N. (2007). Neurofascin assembles a specialized extracellular matrix at the axon initial segment. *The Journal of Cell Biology*, *178*(5), 875–886. <https://doi.org/10.1083/jcb.200705119>
- Housley, W. J., Pitt, D., & Hafler, D. A. (2015). Biomarkers in multiple sclerosis. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, *161*(1), 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2015.06.015>
- Howell, O. W., Reeves, C. A., Nicholas, R., Carassiti, D., Radotra, B., Gentleman, S. M., ... Reynolds, R. (2011). Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain: A Journal of Neurology*, *134*(Pt 9), 2755–2771. <https://doi.org/10.1093/brain/awr182>
- Hu-Li, J., Shevach, E. M., Mizuguchi, J., Ohara, J., Mosmann, T., & Paul, W. E. (1987). B cell stimulatory factor 1 (interleukin 4) is a potent costimulant for normal resting T lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, *165*(1), 157–172.
- Huh, J. R., Leung, M. W. L., Huang, P., Ryan, D. A., Krout, M. R., Malapaka, R. R. V., ... Littman, D. R. (2011). Digoxin and its derivatives suppress TH17 cell differentiation by antagonizing ROR γ activity. *Nature*, *472*(7344), 486–490. <https://doi.org/10.1038/nature09978>
- Im, D. S., & Muzyczka, N. (1990). The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell*, *61*(3), 447–457.
- Im, D. S., & Muzyczka, N. (1992). Partial purification of adeno-associated virus Rep78, Rep52, and Rep40 and their biochemical characterization. *Journal of Virology*, *66*(2), 1119–1128.
- Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., ... Littman, D. R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell*, *126*(6), 1121–1133. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.035>
- Izquierdo, G., Venegas, A., Sanabria, C., & Navarro, G. (2015). Long-term epidemiology of multiple sclerosis in the Northern Seville District. *Acta Neurologica Scandinavica*, *132*(2), 111–117. <https://doi.org/10.1111/ane.12363>
- Ji, Q., Castelli, L., & Goverman, J. M. (2013). MHC class I-restricted myelin epitopes are cross-presented by Tip-DCs that promote determinant spreading to CD8(+) T cells. *Nature Immunology*, *14*(3), 254–261. <https://doi.org/10.1038/ni.2513>

- Ji, T., Xu, C., Sun, L., Yu, M., Peng, K., Qiu, Y., ... Yang, H. (2015). Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Down-Regulates IL-7 and Reduces Inflammation in a Mouse Model of DSS-Induced Colitis. *Digestive Diseases and Sciences*, *60*(7), 1958–1966. <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3632-x>
- Jiang, Q., Li, W. Q., Aiello, F. B., Mazzucchelli, R., Asefa, B., Khaled, A. R., & Durum, S. K. (2005). Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *16*(4–5), 513–533. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.05.004>
- Jin, J.-O., Kawai, T., Cha, S., & Yu, Q. (2013). Interleukin-7 enhances the Th1 response to promote the development of Sjogren's syndrome-like autoimmune exocrinopathy in mice. *Arthritis and Rheumatism*, *65*(8), 2132–2142. <https://doi.org/10.1002/art.38007>
- Jovanovic, D. V., Di Battista, J. A., Martel-Pelletier, J., Jolicoeur, F. C., He, Y., Zhang, M., ... Pelletier, J. P. (1998). IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *160*(7), 3513–3521.
- Kanter, J. L., Narayana, S., Ho, P. P., Catz, I., Warren, K. G., Sobel, R. A., ... Robinson, W. H. (2006). Lipid microarrays identify key mediators of autoimmune brain inflammation. *Nature Medicine*, *12*(1), 138–143. <https://doi.org/10.1038/nm1344>
- Kappos, L., Li, D., Calabresi, P. A., O'Connor, P., Bar-Or, A., Barkhof, F., ... Hauser, S. L. (2011). Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet (London, England)*, *378*(9805), 1779–1787. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61649-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61649-8)
- Kashiwakura, Y., Tamayose, K., Iwabuchi, K., Hirai, Y., Shimada, T., Matsumoto, K., ... Daida, H. (2005). Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Journal of Virology*, *79*(1), 609–614. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.1.609-614.2005>
- Kearney, H., Altmann, D. R., Samson, R. S., Yiannakas, M. C., Wheeler-Kingshott, C. A. M., Ciccarelli, O., & Miller, D. H. (2015). Cervical cord lesion load is associated with disability independently from atrophy in MS. *Neurology*, *84*(4), 367–373. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001186>
- Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., ... Prat, A. (2007). Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nature Medicine*, *13*(10), 1173–1175. <https://doi.org/10.1038/nm1651>
- Kennedy, M. K., Tan, L. J., Dal Canto, M. C., Tuohy, V. K., Lu, Z. J., Trotter, J. L., & Miller, S. D. (1990).

- Inhibition of murine relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis by immune tolerance to proteolipid protein and its encephalitogenic peptides. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *144*(3), 909–915.
- Kim, B.-J., Zhou, J., Martin, B., Carlson, O. D., Maudsley, S., Greig, N. H., ... Egan, J. M. (2010). Transferrin fusion technology: a novel approach to prolonging biological half-life of insulinotropic peptides. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *334*(3), 682–692. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.166470>
- Kivisakk, P., Mahad, D. J., Callahan, M. K., Trebst, C., Tucky, B., Wei, T., ... Ransohoff, R. M. (2003). Human cerebrospinal fluid central memory CD4+ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(14), 8389–8394. <https://doi.org/10.1073/pnas.1433000100>
- Klein, J. S., Jiang, S., Galimidi, R. P., Keeffe, J. R., & Bjorkman, P. J. (2014). Design and characterization of structured protein linkers with differing flexibilities. *Protein Engineering, Design & Selection : PEDS*, *27*(10), 325–330. <https://doi.org/10.1093/protein/gzu043>
- Kleinewietfeld, M., Manzel, A., Titze, J., Kvakana, H., Yosef, N., Linker, R. A., ... Hafler, D. A. (2013). Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature*, *496*(7446), 518–522. <https://doi.org/10.1038/nature11868>
- Koch-Henriksen, N., & Sorensen, P. S. (2010). The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *The Lancet. Neurology*, *9*(5), 520–532. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70064-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70064-8)
- Kojima, K., Wekerle, H., Lassmann, H., Berger, T., & Linington, C. (1997). Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4+ T cells specific for an astrocyte protein, S100 beta. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, *49*, 43–51.
- Kondrack, R. M., Harbertson, J., Tan, J. T., McBreen, M. E., Surh, C. D., & Bradley, L. M. (2003). Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *198*(12), 1797–1806. <https://doi.org/10.1084/jem.20030735>
- Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jager, A., Strom, T. B., ... Kuchroo, V. K. (2007). IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature*, *448*(7152), 484–487. <https://doi.org/10.1038/nature05970>
- Korn, T., Reddy, J., Gao, W., Bettelli, E., Awasthi, A., Petersen, T. R., ... Kuchroo, V. K. (2007). Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nature Medicine*, *13*(4), 423–431. <https://doi.org/10.1038/nm1564>

- Kotake, S., Udagawa, N., Takahashi, N., Matsuzaki, K., Itoh, K., Ishiyama, S., ... Suda, T. (1999). IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, *103*(9), 1345–1352. <https://doi.org/10.1172/JCI5703>
- Kotin, R. M., Siniscalco, M., Samulski, R. J., Zhu, X. D., Hunter, L., Laughlin, C. A., ... Berns, K. I. (1990). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*(6), 2211–2215.
- Kreft, K. L., Verbraak, E., Wierenga-Wolf, A. F., van Meurs, M., Oostra, B. A., Laman, J. D., & Hintzen, R. Q. (2012). Decreased systemic IL-7 and soluble IL-7Ralpha in multiple sclerosis patients. *Genes and Immunity*, *13*(7), 587–592. <https://doi.org/10.1038/gene.2012.34>
- Kremlev, S. G., Gournier-Hausser, A. L., Del Valle, L., Perez-Liz, G., Dimitrov, S., & Tuszynski, G. (2008). Angiocidin promotes pro-inflammatory cytokine production and antigen presentation in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, *194*(1–2), 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2007.11.003>
- Krishnamoorthy, G., Saxena, A., Mars, L. T., Domingues, H. S., Mentele, R., Ben-Nun, A., ... Wekerle, H. (2009). Myelin-specific T cells also recognize neuronal autoantigen in a transgenic mouse model of multiple sclerosis. *Nature Medicine*, *15*(6), 626–632. <https://doi.org/10.1038/nm.1975>
- Kuijk, L. M., Klaver, E. J., Kooij, G., van der Pol, S. M. A., Heijnen, P., Bruijns, S. C. M., ... van Die, I. (2012). Soluble helminth products suppress clinical signs in murine experimental autoimmune encephalomyelitis and differentially modulate human dendritic cell activation. *Molecular Immunology*, *51*(2), 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.03.020>
- La Flamme, A. C., Ruddenklau, K., & Backstrom, B. T. (2003). Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Infection and Immunity*, *71*(9), 4996–5004.
- Laatsch, R. H., Kies, M. W., Gordon, S., & Alvord, E. C. J. (1962). The encephalomyelitic activity of myelin isolated by ultracentrifugation. *The Journal of Experimental Medicine*, *115*, 777–788.
- Langer-Gould, A., Atlas, S. W., Green, A. J., Bollen, A. W., & Pelletier, D. (2005). Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with natalizumab. *The New England Journal of Medicine*, *353*(4), 375–381. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa051847>
- Langer-Gould, A., Brara, S. M., Beaber, B. E., & Koebnick, C. (2013). Childhood obesity and risk of pediatric multiple sclerosis and clinically isolated syndrome. *Neurology*, *80*(6), 548–552. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31828154f3>

- Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J. D., ... Cua, D. J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(2), 233–240. <https://doi.org/10.1084/jem.20041257>
- Lebar, R., Lubetzki, C., Vincent, C., Lombail, P., & Boutry, J. M. (1986). The M2 autoantigen of central nervous system myelin, a glycoprotein present in oligodendrocyte membrane. *Clinical and Experimental Immunology*, 66(2), 423–434.
- Lee, L.-F., Axtell, R., Tu, G. H., Logronio, K., Dilley, J., Yu, J., ... Lin, J. C. (2011). IL-7 promotes T(H)1 development and serum IL-7 predicts clinical response to interferon-beta in multiple sclerosis. *Science Translational Medicine*, 3(93), 93ra68. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002400>
- Leung, S., Liu, X., Fang, L., Chen, X., Guo, T., & Zhang, J. (2010). The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. *Cellular & Molecular Immunology*, 7(3), 182–189. <https://doi.org/10.1038/cmi.2010.22>
- Lichtman, A. H., Kurt-Jones, E. A., & Abbas, A. K. (1987). B-cell stimulatory factor 1 and not interleukin 2 is the autocrine growth factor for some helper T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(3), 824–827.
- Ling, C., Lu, Y., Kalsi, J. K., Jayandharan, G. R., Li, B., Ma, W., ... Srivastava, A. (2010). Human hepatocyte growth factor receptor is a cellular coreceptor for adeno-associated virus serotype 3. *Human Gene Therapy*, 21(12), 1741–1747. <https://doi.org/10.1089/hum.2010.075>
- Link, A., Vogt, T. K., Favre, S., Britschgi, M. R., Acha-Orbea, H., Hinz, B., ... Luther, S. A. (2007). Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nature Immunology*, 8(11), 1255–1265. <https://doi.org/10.1038/ni1513>
- Liu, X., Leung, S., Wang, C., Tan, Z., Wang, J., Guo, T. B., ... Zhang, J. Z. (2010). Crucial role of interleukin-7 in T helper type 17 survival and expansion in autoimmune disease. *Nature Medicine*, 16(2), 191–197. <https://doi.org/10.1038/nm.2077>
- Lock, C., Hermans, G., Pedotti, R., Brendolan, A., Schadt, E., Garren, H., ... Steinman, L. (2002). Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nature Medicine*, 8(5), 500–508. <https://doi.org/10.1038/nm0502-500>
- Lublin, F. D. (2014). New multiple sclerosis phenotypic classification. *European Neurology*, 72 Suppl 1, 1–5. <https://doi.org/10.1159/000367614>
- Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., & Lassmann, H. (2000).

Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of Neurology*, 47(6), 707–717.

Lundstrom, W., Highfill, S., Walsh, S. T. R., Beq, S., Morse, E., Kockum, I., ... Mackall, C. L. (2013). Soluble IL7 α potentiates IL-7 bioactivity and promotes autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(19), E1761-70. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222303110>

Lunemann, J. D., Edwards, N., Muraro, P. A., Hayashi, S., Cohen, J. I., Munz, C., & Martin, R. (2006). Increased frequency and broadened specificity of latent EBV nuclear antigen-1-specific T cells in multiple sclerosis. *Brain: A Journal of Neurology*, 129(Pt 6), 1493–1506. <https://doi.org/10.1093/brain/awl067>

Lunny, C., Knopp-Sihota, J. A., & Fraser, S. N. (2013). Surgery and risk for multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. *BMC Neurology*, 13, 41. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-13-41>

Lusby, E., Fife, K. H., & Berns, K. I. (1980). Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *Journal of Virology*, 34(2), 402–409.

Maatta, J. A., Kaldman, M. S., Sakoda, S., Salmi, A. A., & Hinkkanen, A. E. (1998). Encephalitogenicity of myelin-associated oligodendrocytic basic protein and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase for BALB/c and SJL mice. *Immunology*, 95(3), 383–388.

Mata, S., Lolli, F., Soderstrom, M., Pinto, F., & Link, H. (1999). Multiple sclerosis is associated with enhanced B cell responses to the ganglioside GD1a. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 5(6), 379–388. <https://doi.org/10.1177/135245859900500i603>

Mathey, E. K., Derfuss, T., Storch, M. K., Williams, K. R., Hales, K., Woolley, D. R., ... Linington, C. (2007). Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(10), 2363–2372. <https://doi.org/10.1084/jem.20071053>

Matsushima, G. K., & Morell, P. (2001). The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 11(1), 107–116.

Mayer, M. C., & Meinl, E. (2012). Glycoproteins as targets of autoantibodies in CNS inflammation: MOG and more. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 5(3), 147–159. <https://doi.org/10.1177/1756285611433772>

McGeachy, M. J., Chen, Y., Tato, C. M., Laurence, A., Joyce-Shaikh, B., Blumenschein, W. M., ... Cua, D. J. (2009). The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nature Immunology*, 10(3), 314–324.

<https://doi.org/10.1038/ni.1698>

- McGeachy, M. J., Stephens, L. A., & Anderton, S. M. (2005). Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *175*(5), 3025–3032.
- McMahon, E. J., Bailey, S. L., Castenada, C. V., Waldner, H., & Miller, S. D. (2005). Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nature Medicine*, *11*(3), 335–339. <https://doi.org/10.1038/nm1202>
- McPherson, R. A., & Rose, J. A. (1983). Structural proteins of adenovirus-associated virus: subspecies and their relatedness. *Journal of Virology*, *46*(2), 523–529.
- Meier, D., Bornmann, C., Chappaz, S., Schmutz, S., Otten, L. A., Ceredig, R., ... Finke, D. (2007). Ectopic lymphoid-organ development occurs through interleukin 7-mediated enhanced survival of lymphoid-tissue-inducer cells. *Immunity*, *26*(5), 643–654. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.04.009>
- Miller, S. D., Vanderlugt, C. L., Begolka, W. S., Pao, W., Yauch, R. L., Neville, K. L., ... Kim, B. S. (1997). Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nature Medicine*, *3*(10), 1133–1136.
- Miralles, M., Eixarch, H., Tejero, M., Costa, C., Hirota, K., Castano, A. R., ... Chillon, M. (2017). Clinical and Histopathological Amelioration of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by AAV Vectors Expressing a Soluble Interleukin-23 Receptor. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, *14*(4), 1095–1106. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0545-8>
- Miralles, M., Garcia, M., Tejero, M., Bosch, A., & Chillon, M. (2014). Production of chimeric adenovirus. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1089*, 231–243. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-679-5_16
- Mix, E., Meyer-Rienecker, H., Hartung, H.-P., & Zettl, U. K. (2010). Animal models of multiple sclerosis--potentials and limitations. *Progress in Neurobiology*, *92*(3), 386–404. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.06.005>
- Moreno, B., Espejo, C., Mestre, L., Suardiaz, M., Clemente, D., de Castro, F., ... Guaza, C. (2012). [Guidelines on the appropriate use of animal models for developing therapies in multiple sclerosis]. *Revista de neurologia*, *54*(2), 114–124.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., & Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *136*(7), 2348–2357.

- Munger, K. L., Chitnis, T., & Ascherio, A. (2009). Body size and risk of MS in two cohorts of US women. *Neurology*, *73*(19), 1543–1550. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181c0d6e0>
- Munger, K. L., Levin, L. I., Hollis, B. W., Howard, N. S., & Ascherio, A. (2006). Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*, *296*(23), 2832–2838. <https://doi.org/10.1001/jama.296.23.2832>
- Muraro, P. A., Kalbus, M., Afshar, G., McFarland, H. F., & Martin, R. (2002). T cell response to 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) in multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology*, *130*(1–2), 233–242.
- Nakai, H., Yant, S. R., Storm, T. A., Fuess, S., Meuse, L., & Kay, M. A. (2001). Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *Journal of Virology*, *75*(15), 6969–6976. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.15.6969-6976.2001>
- Narazaki, M., Tanaka, T., & Kishimoto, T. (2017). The role and therapeutic targeting of IL-6 in rheumatoid arthritis. *Expert Review of Clinical Immunology*, *13*(6), 535–551. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2017.1295850>
- Naumer, M., Sonntag, F., Schmidt, K., Nieto, K., Panke, C., Davey, N. E., ... Kleinschmidt, J. A. (2012). Properties of the adeno-associated virus assembly-activating protein. *Journal of Virology*, *86*(23), 13038–13048. <https://doi.org/10.1128/JVI.01675-12>
- Noelle, R. J., & Nowak, E. C. (2010). Cellular sources and immune functions of interleukin-9. *Nature Reviews. Immunology*, *10*(10), 683–687. <https://doi.org/10.1038/nri2848>
- Noster, R., Riedel, R., Mashreghi, M.-F., Radbruch, H., Harms, L., Haftmann, C., ... Zielinski, C. E. (2014). IL-17 and GM-CSF expression are antagonistically regulated by human T helper cells. *Science Translational Medicine*, *6*(241), 241ra80. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008706>
- O'Connor, R. A., Malpass, K. H., & Anderton, S. M. (2007). The inflamed central nervous system drives the activation and rapid proliferation of Foxp3+ regulatory T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *179*(2), 958–966.
- Ogston, P., Raj, K., & Beard, P. (2000). Productive replication of adeno-associated virus can occur in human papillomavirus type 16 (HPV-16) episome-containing keratinocytes and is augmented by the HPV-16 E2 protein. *Journal of Virology*, *74*(8), 3494–3504.
- Ohler, B., Graf, K., Bragg, R., Lemons, T., Coe, R., Genain, C., ... Husted, C. (2004). Role of lipid interactions in autoimmune demyelination. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1688*(1), 10–17.
- Opferman, J. T., Letai, A., Beard, C., Sorcinelli, M. D., Ong, C. C., & Korsmeyer, S. J. (2003). Development

and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature*, 426(6967), 671–676. <https://doi.org/10.1038/nature02067>

Owens, T. (2006). Animal models for multiple sclerosis. *Advances in Neurology*, 98, 77–89.

Palanichamy, A., Apeltsin, L., Kuo, T. C., Sirota, M., Wang, S., Pitts, S. J., ... von Budingen, H.-C. (2014). Immunoglobulin class-switched B cells form an active immune axis between CNS and periphery in multiple sclerosis. *Science Translational Medicine*, 6(248), 248ra106. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008930>

Parham, C., Chirica, M., Timans, J., Vaisberg, E., Travis, M., Cheung, J., ... Moore, K. W. (2002). A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(11), 5699–5708.

Park, J.-H., Adoro, S., Guintier, T., Erman, B., Alag, A. S., Catalfamo, M., ... Singer, A. (2010). Signaling by intrathymic cytokines, not T cell antigen receptors, specifies CD8 lineage choice and promotes the differentiation of cytotoxic-lineage T cells. *Nature Immunology*, 11(3), 257–264. <https://doi.org/10.1038/ni.1840>

Park, Martin, U., Garka, K., Gliniak, B., Di Santo, J. P., Muller, W., ... Sims, J. E. (2000). Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(5), 659–670.

Patas, K., Engler, J. B., Friese, M. A., & Gold, S. M. (2013). Pregnancy and multiple sclerosis: fetomaternal immune cross talk and its implications for disease activity. *Journal of Reproductive Immunology*, 97(1), 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.10.005>

Pathak, K. (2014). The expanding role of IL-7 and thymic stromal lymphopoietin as therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 18(5), 581–594. <https://doi.org/10.1517/14728222.2014.893295>

Penaranda, C., Kuswanto, W., Hofmann, J., Kenefeck, R., Narendran, P., Walker, L. S. K., ... Dooks, H. (2012). IL-7 receptor blockade reverses autoimmune diabetes by promoting inhibition of effector/memory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31), 12668–12673. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203692109>

Pender, M. P., Csurhes, P. A., Wolfe, N. P., Hooper, K. D., Good, M. F., McCombe, P. A., & Greer, J. M. (2003). Increased circulating T cell reactivity to GM3 and GQ1b gangliosides in primary progressive multiple sclerosis. *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 10(1), 63–66.

- Peschon, J. J., Morrissey, P. J., Grabstein, K. H., Ramsdell, F. J., Maraskovsky, E., Gliniak, B. C., ... Davison, B. L. (1994). Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *The Journal of Experimental Medicine*, *180*(5), 1955–1960. <https://doi.org/10.1084/jem.180.5.1955>
- Peters, M., Jacobs, S., Ehlers, M., Vollmer, P., Mullberg, J., Wolf, E., ... Rose-John, S. (1996). The function of the soluble interleukin 6 (IL-6) receptor in vivo: sensitization of human soluble IL-6 receptor transgenic mice towards IL-6 and prolongation of the plasma half-life of IL-6. *The Journal of Experimental Medicine*, *183*(4), 1399–1406.
- Piedra, J., Ontiveros, M., Miravet, S., Penalva, C., Monfar, M., & Chillón, M. (2015). Development of a rapid, robust, and universal picogreen-based method to titer adeno-associated vectors. *Human Gene Therapy Methods*, *26*(1), 35–42. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2014.120>
- Pietrangeli, C. E., Hayashi, S., & Kincade, P. W. (1988). Stromal cell lines which support lymphocyte growth: characterization, sensitivity to radiation and responsiveness to growth factors. *European Journal of Immunology*, *18*(6), 863–872. <https://doi.org/10.1002/eji.1830180606>
- Pugliatti, M., Rosati, G., Carton, H., Riise, T., Drulovic, J., Vecsei, L., & Milanov, I. (2006). The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *European Journal of Neurology*, *13*(7), 700–722. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2006.01342.x>
- Pugliatti, M., Sotgiu, S., & Rosati, G. (2002). The worldwide prevalence of multiple sclerosis. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, *104*(3), 182–191.
- Qin, J., Goswami, R., Balabanov, R., & Dawson, G. (2007). Oxidized phosphatidylcholine is a marker for neuroinflammation in multiple sclerosis brain. *Journal of Neuroscience Research*, *85*(5), 977–984. <https://doi.org/10.1002/jnr.21206>
- Qing, K., Mah, C., Hansen, J., Zhou, S., Dwarki, V., & Srivastava, A. (1999). Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nature Medicine*, *5*(1), 71–77. <https://doi.org/10.1038/4758>
- Quintana, F. J., Farez, M. F., Viglietta, V., Iglesias, A. H., Merbl, Y., Izquierdo, G., ... Weiner, H. L. (2008). Antigen microarrays identify unique serum autoantibody signatures in clinical and pathologic subtypes of multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(48), 18889–18894. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806310105>
- Rabinowitz, J. E., Rolling, F., Li, C., Conrath, H., Xiao, W., Xiao, X., & Samulski, R. J. (2002). Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *Journal of Virology*, *76*(2), 791–801.
- Radbruch, A., & Isaacs, J. (2009, August). Animal models in infection and inflammation - chance and

necessity. *European Journal of Immunology*. Germany.
<https://doi.org/10.1002/eji.200939772>

- Ransohoff, R. M., & Engelhardt, B. (2012). The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nature Reviews. Immunology*, *12*(9), 623–635.
<https://doi.org/10.1038/nri3265>
- Rathmell, J. C., Farkash, E. A., Gao, W., & Thompson, C. B. (2001). IL-7 enhances the survival and maintains the size of naive T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *167*(12), 6869–6876.
- Reboldi, A., Coisne, C., Baumjohann, D., Benvenuto, F., Bottinelli, D., Lira, S., ... Sallusto, F. (2009). C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nature Immunology*, *10*(5), 514–523.
<https://doi.org/10.1038/ni.1716>
- Rengarajan, J., Szabo, S. J., & Glimcher, L. H. (2000). Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunology Today*, *21*(10), 479–483.
- Rich, B. E., Campos-Torres, J., Tepper, R. I., Moreadith, R. W., & Leder, P. (1993). Cutaneous lymphoproliferation and lymphomas in interleukin 7 transgenic mice. *The Journal of Experimental Medicine*, *177*(2), 305–316.
- Robinson, D. P., & Klein, S. L. (2012). Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. *Hormones and Behavior*, *62*(3), 263–271.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.02.023>
- Rosener, M., Muraro, P. A., Riethmuller, A., Kalbus, M., Sappeler, G., Thompson, R. J., ... Martin, R. (1997). 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: a novel candidate autoantigen in demyelinating diseases. *Journal of Neuroimmunology*, *75*(1–2), 28–34.
- Samaridis, J., Casorati, G., Traunecker, A., Iglesias, A., Gutierrez, J. C., Muller, U., & Palacios, R. (1991). Development of lymphocytes in interleukin 7-transgenic mice. *European Journal of Immunology*, *21*(2), 453–460. <https://doi.org/10.1002/eji.1830210230>
- Samulski, R. J., Zhu, X., Xiao, X., Brook, J. D., Housman, D. E., Epstein, N., & Hunter, L. A. (1991). Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *The EMBO Journal*, *10*(12), 3941–3950.
- Santiago, O., Gutierrez, J., Sorlozano, A., de Dios Luna, J., Villegas, E., & Fernandez, O. (2010). Relation between Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: analytic study of scientific production. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, *29*(7), 857–866. <https://doi.org/10.1007/s10096->

- Sawcer, S., Hellenthal, G., Pirinen, M., Spencer, C. C. A., Patsopoulos, N. A., Moutsianas, L., ... Compston, A. (2011). Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*, *476*(7359), 214–219. <https://doi.org/10.1038/nature10251>
- Schlehofer, J. R., Ehrbar, M., & zur Hausen, H. (1986). Vaccinia virus, herpes simplex virus, and carcinogens induce DNA amplification in a human cell line and support replication of a helper virus dependent parvovirus. *Virology*, *152*(1), 110–117.
- Schleithoff, S. S., Zittermann, A., Tenderich, G., Berthold, H. K., Stehle, P., & Koerfer, R. (2006). Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *83*(4), 754–759. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.4.754>
- Schmidt, M., Govindasamy, L., Afione, S., Kaludov, N., Agbandje-McKenna, M., & Chiorini, J. A. (2008). Molecular characterization of the heparin-dependent transduction domain on the capsid of a novel adeno-associated virus isolate, AAV(VR-942). *Journal of Virology*, *82*(17), 8911–8916. <https://doi.org/10.1128/JVI.00672-08>
- Schmidt, S. R. (2009). Fusion-proteins as biopharmaceuticals--applications and challenges. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, *12*(2), 284–295.
- Segal, B. M., Constantinescu, C. S., Raychaudhuri, A., Kim, L., Fidelus-Gort, R., & Kasper, L. H. (2008). Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study. *The Lancet. Neurology*, *7*(9), 796–804. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70173-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70173-X)
- Seiler, M. P., Miller, A. D., Zabner, J., & Halbert, C. L. (2006). Adeno-associated virus types 5 and 6 use distinct receptors for cell entry. *Human Gene Therapy*, *17*(1), 10–19. <https://doi.org/10.1089/hum.2006.17.10>
- Serada, S., Fujimoto, M., Mihara, M., Koike, N., Ohsugi, Y., Nomura, S., ... Naka, T. (2008). IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(26), 9041–9046. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802218105>
- Shamshiev, A., Donda, A., Carena, I., Mori, L., Kappos, L., & De Libero, G. (1999). Self glycolipids as T-cell autoantigens. *European Journal of Immunology*, *29*(5), 1667–1675. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199905\)29:05<1667::AID-IMMU1667>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199905)29:05<1667::AID-IMMU1667>3.0.CO;2-U)

- Shen, S., Berry, G. E., Castellanos Rivera, R. M., Cheung, R. Y., Troupes, A. N., Brown, S. M., ... Asokan, A. (2015). Functional analysis of the putative integrin recognition motif on adeno-associated virus 9. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*(3), 1496–1504. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.608281>
- Shen, S., Bryant, K. D., Brown, S. M., Randell, S. H., & Asokan, A. (2011). Terminal N-linked galactose is the primary receptor for adeno-associated virus 9. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(15), 13532–13540. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.210922>
- Sie, C., Korn, T., & Mitsdoerffer, M. (2014). Th17 cells in central nervous system autoimmunity. *Experimental Neurology*, *262 Pt A*, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.03.009>
- Solt, L. A., Kumar, N., Nuhant, P., Wang, Y., Lauer, J. L., Liu, J., ... Burriss, T. P. (2011). Suppression of TH17 differentiation and autoimmunity by a synthetic ROR ligand. *Nature*, *472*(7344), 491–494. <https://doi.org/10.1038/nature10075>
- Sprent, J., & Surh, C. D. (2011). Normal T cell homeostasis: the conversion of naive cells into memory-phenotype cells. *Nature Immunology*, *12*(6), 478–484.
- Srivastava, A., Lusby, E. W., & Berns, K. I. (1983). Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *Journal of Virology*, *45*(2), 555–564.
- Steinman, L., & Zamvil, S. S. (2005). Virtues and pitfalls of EAE for the development of therapies for multiple sclerosis. *Trends in Immunology*, *26*(11), 565–571. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.08.014>
- Stern, J. N. H., Yaari, G., Vander Heiden, J. A., Church, G., Donahue, W. F., Hintzen, R. Q., ... O'Connor, K. C. (2014). B cells populating the multiple sclerosis brain mature in the draining cervical lymph nodes. *Science Translational Medicine*, *6*(248), 248ra107. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008879>
- Stilund, M., Gjelstrup, M. C., Petersen, T., Moller, H. J., Rasmussen, P. V., & Christensen, T. (2015). Biomarkers of inflammation and axonal degeneration/damage in patients with newly diagnosed multiple sclerosis: contributions of the soluble CD163 CSF/serum ratio to a biomarker panel. *PloS One*, *10*(4), e0119681. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119681>
- Stritesky, G. L., Yeh, N., & Kaplan, M. H. (2008). IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *181*(9), 5948–5955.
- Sugiyama, H., Gyulai, R., Toichi, E., Garaczi, E., Shimada, S., Stevens, S. R., ... Cooper, K. D. (2005). Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *174*(1), 164–173.

- Summerford, C., Bartlett, J. S., & Samulski, R. J. (1999). AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nature Medicine*, 5(1), 78–82. <https://doi.org/10.1038/4768>
- Summerford, C., & Samulski, R. J. (1998). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *Journal of Virology*, 72(2), 1438–1445.
- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., & Glimcher, L. H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, 100(6), 655–669.
- Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., ... Sakaguchi, S. (2000). Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(2), 303–310.
- Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(5), 523–533. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1158-6>
- Teunissen, M. B., Koomen, C. W., de Waal Malefyt, R., Wierenga, E. A., & Bos, J. D. (1998). Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *The Journal of Investigative Dermatology*, 111(4), 645–649. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00347.x>
- Trapp, B. D., Peterson, J., Ransohoff, R. M., Rudick, R., Mork, S., & Bo, L. (1998). Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 338(5), 278–285. <https://doi.org/10.1056/NEJM199801293380502>
- Tuohy, V. K., Lu, Z. J., Sobel, R. A., Laursen, R. A., & Lees, M. B. (1988). A synthetic peptide from myelin proteolipid protein induces experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 141(4), 1126–1130.
- Tzartos, J. S., Friese, M. A., Craner, M. J., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M. M., & Fugger, L. (2008). Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *The American Journal of Pathology*, 172(1), 146–155. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070690>
- Venken, K., Hellings, N., Thewissen, M., Somers, V., Hensen, K., Rummens, J.-L., ... Stinissen, P. (2008). Compromised CD4+ CD25(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunology*, 123(1), 79–89. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02690.x>

- Versini, M., Jeandel, P.-Y., Bashi, T., Bizzaro, G., Blank, M., & Shoenfeld, Y. (2015). Unraveling the Hygiene Hypothesis of helminthes and autoimmunity: origins, pathophysiology, and clinical applications. *BMC Medicine*, *13*, 81. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0306-7>
- Vignali, D. A. A., & Kuchroo, V. K. (2012). IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature Immunology*, *13*(8), 722–728. <https://doi.org/10.1038/ni.2366>
- Voorhuis, J. A., Uitdehaag, B. M., De Groot, C. J., Goede, P. H., van der Meide, P. H., & Dijkstra, C. D. (1990). Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by intraventricular administration of interferon-gamma in Lewis rats. *Clinical and Experimental Immunology*, *81*(2), 183–188.
- Walters, R. W., Pilewski, J. M., Chiorini, J. A., & Zabner, J. (2002). Secreted and transmembrane mucins inhibit gene transfer with AAV4 more efficiently than AAV5. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(26), 23709–23713. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200292200>
- Walters, R. W., Yi, S. M., Keshavjee, S., Brown, K. E., Welsh, M. J., Chiorini, J. A., & Zabner, J. (2001). Binding of adeno-associated virus type 5 to 2,3-linked sialic acid is required for gene transfer. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(23), 20610–20616. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101559200>
- Walz, C., Deprez, A., Dupressoir, T., Durst, M., Rabreau, M., & Schlehofer, J. R. (1997). Interaction of human papillomavirus type 16 and adeno-associated virus type 2 co-infecting human cervical epithelium. *The Journal of General Virology*, *78* (Pt 6), 1441–1452. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-6-1441>
- Wang, L., Wang, F.-S., & Gershwin, M. E. (2015). Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *Journal of Internal Medicine*, *278*(4), 369–395. <https://doi.org/10.1111/joim.12395>
- Weimer, T., Wormsbacher, W., Kronthaler, U., Lang, W., Liebing, U., & Schulte, S. (2008). Prolonged in-vivo half-life of factor VIIa by fusion to albumin. *Thrombosis and Haemostasis*, *99*(4), 659–667. <https://doi.org/10.1160/TH07-08-0525>
- Weller, M. L., Amornphimoltham, P., Schmidt, M., Wilson, P. A., Gutkind, J. S., & Chiorini, J. A. (2010). Epidermal growth factor receptor is a co-receptor for adeno-associated virus serotype 6. *Nature Medicine*, *16*(6), 662–664. <https://doi.org/10.1038/nm.2145>
- Wiendl, H., & Gross, C. C. (2013). Modulation of IL-2Ralpha with daclizumab for treatment of multiple sclerosis. *Nature Reviews. Neurology*, *9*(7), 394–404. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2013.95>
- Willing, A., Leach, O. A., Ufer, F., Attfield, K. E., Steinbach, K., Kursawe, N., ... Friese, M. A. (2014). CD8(+) MAIT cells infiltrate into the CNS and alterations in their blood frequencies correlate

- with IL-18 serum levels in multiple sclerosis. *European Journal of Immunology*, 44(10), 3119–3128. <https://doi.org/10.1002/eji.201344160>
- Wu, C., Yosef, N., Thalhamer, T., Zhu, C., Xiao, S., Kishi, Y., ... Kuchroo, V. K. (2013). Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature*, 496(7446), 513–517. <https://doi.org/10.1038/nature11984>
- Wu, Z., Miller, E., Agbandje-McKenna, M., & Samulski, R. J. (2006). Alpha2,3 and alpha2,6 N-linked sialic acids facilitate efficient binding and transduction by adeno-associated virus types 1 and 6. *Journal of Virology*, 80(18), 9093–9103. <https://doi.org/10.1128/JVI.00895-06>
- Xiao, X., Li, J., & Samulski, R. J. (1998). Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *Journal of Virology*, 72(3), 2224–2232.
- Xu, T., Wang, X., Zhong, B., Nurieva, R. I., Ding, S., & Dong, C. (2011). Ursolic acid suppresses interleukin-17 (IL-17) production by selectively antagonizing the function of RORgamma t protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(26), 22707–22710. <https://doi.org/10.1074/jbc.C111.250407>
- Xu, Z., Smith, J. S., Tian, J., & Byrnes, A. P. (2010). Induction of shock after intravenous injection of adenovirus vectors: a critical role for platelet-activating factor. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(3), 609–616. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.279>
- Yednock, T. A., Cannon, C., Fritz, L. C., Sanchez-Madrid, F., Steinman, L., & Karin, N. (1992). Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature*, 356(6364), 63–66. <https://doi.org/10.1038/356063a0>
- Yuste, R. (2005). Fluorescence microscopy today. *Nature Methods*, 2(12), 902–904. <https://doi.org/10.1038/nmeth1205-902>
- Zaiss, A.-K., Liu, Q., Bowen, G. P., Wong, N. C. W., Bartlett, J. S., & Muruve, D. A. (2002). Differential activation of innate immune responses by adenovirus and adeno-associated virus vectors. *Journal of Virology*, 76(9), 4580–4590.
- Zhang, X.-Y., Zhang, H.-J., Zhang, Y., Fu, Y.-J., He, J., Zhu, L.-P., ... Liu, L. (2006). Identification and expression analysis of alternatively spliced isoforms of human interleukin-23 receptor gene in normal lymphoid cells and selected tumor cells. *Immunogenetics*, 57(12), 934–943. <https://doi.org/10.1007/s00251-005-0067-0>
- Zhou, L., Ivanov, I. I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., ... Littman, D. R. (2007). IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature Immunology*, 8(9), 967–974. <https://doi.org/10.1038/ni1488>

- Zhou, L., Lopes, J. E., Chong, M. M. W., Ivanov, I. I., Min, R., Victora, G. D., ... Littman, D. R. (2008). TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. *Nature*, 453(7192), 236–240. <https://doi.org/10.1038/nature06878>
- Zielinski, C. E., Mele, F., Aschenbrenner, D., Jarrossay, D., Ronchi, F., Gattorno, M., ... Sallusto, F. (2012). Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta. *Nature*, 484(7395), 514–518. <https://doi.org/10.1038/nature10957>
- Zolotukhin, S., Byrne, B. J., Mason, E., Zolotukhin, I., Potter, M., Chesnut, K., ... Muzyczka, N. (1999). Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Therapy*, 6(6), 973–985. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300938>

ANEXO

1. PLÁSMIDOS GENERADOS

Plásmidos
pTG6600 CMV sIL-7R ¹
pTG6600 CMV IL-7R
pTG6600 CMV sIL-23R
pTG6600 CMV sIL-23R-Linker
pTG6600 CMV sIL-23R-sIL-7R
pKP1.4 CMV sIL-7R ²
pKP1.4 CMV IL-7R
pKP1.4 CMV sIL-23R
pKP1.4 CMV sIL-23R-sIL-7R
pAAV CAG sIL-7R ³
pAAV CAG IL-7R
pAAV CAG sIL-23R
pAAV CAG sIL-23R-sIL-7R
pGV CMV sIL-7R ⁴
pGV CMV sIL-23R
pGV CMV sIL-23R-sIL-7R
pGV CMV LacZ
pEBG-2T sIL-7R ⁵
pEBG-2T sIL-23R
pEBG-2T sIL-23R-sIL-7R
pGEX-6P-2 sIL-7R ⁶
pGEX-6P-2 sIL-23R
pGEX-6P-2 sIL-23R-sIL-7R

¹ pTG6600: Plásmido lanzadera para la producción de Ad5.

² pKP1.4: Plásmido que contiene el genoma del Ad5 para su producción.

³ pAAV: Plásmido para la generación de AAVs con el promotor CAG.

⁴ pGV: Plásmido para la generación de AAVs con el promotor CMV.

⁵ pEBG-2T: Plásmido para la producción de proteínas GST en eucariotas.

⁶ pGEX-6P: Plásmido para la producción de proteínas GST en procariotas.

2. VECTORES VIRALES GENERADOS Y PRODUCIDOS

Vectores adenovirales
Ad5 CMV sIL-23R
Ad5 CMV sIL-7R
Ad5 CMV sIL-23R-sIL-7R
Ad5 CMV GFP

Vectores adenoasociados
AAV 2/9 CAG sIL-23R
AAV 2/9 CAG sIL-7R
AAV 2/9 CAG sIL-23R-sIL-7R
AAV 2/9 CAG Null
AAV 2/8 CAG sIL-23R
AAV 2/8 CAG sIL-7R
AAV 2/8 CAG Null
AAV 2/8 CMV sIL-23R
AAV 2/8 CMV sIL-7R
AAV 2/8 CMV sIL-23R-sIL-7R
AAV 2/8 CMV Null
AAV 2/8 CMV Bgal

3. PRIMERS

Gen	Primer	Secuencia
sIL-7R	Fw	5'- GAACCCAAGAATCAAGGATTA -3'
	Rv	5'- TCAGACTCGTTTTGGCTTCTT -3'
IL-7R	Fw	5'- GAACCCAAGAATCAAGGAGG -3'
	Rv	5'- CATTAGACTCGTTTTGGCT -3'
sIL-23R	Fw	5'- CAGGTGACAGCTAAGTCCAGT -3'
	Rv	5'- CTCGAAGCATTAAACCCTCACT -3'
sIL-23R-sIL-7R	Fw	5'- TTTCGCGGACATCCTGCATC-3'
	Rv	5'- TCTACCCAGAGCCATCATCC-3'
m36B4	Fw	5'- ATGGGTACAAGCGCGTCCTG-3'
	Rv	5'- AGCCGCAAATGCAGATGGATC-3'

4. OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LA GENERACIÓN DEL LINKER DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN sIL-23R-sIL-7R

Primer polylinker (forward)

5'-CCGGATTGAAGGAGGGCTCCTATTGCatttgaaggcagtataggaggcggtggctcggcggtggtgggtcggtgtaaatggcattccaCTCGAGC-3'

Primer polylinker (reverse)

5'-CCGGGCTCGAGtggaatgccattacaaccgaccaccaccgcccagccaccgcctcctatactgcccttcaaatGCAATAGGAGCCCTCCTCAAT-3'

5. ANTICUERPOS

Anticuerpo Primario	Casa comercial	Referencia	Huésped
Actina	Sigma-Aldrich	A-2066	Rabbit
GADPH (14C10)	Cell Singaling Technologies	2118	Rabbit
GST (z-5)	Santa Cruz Biotechnology	SC-459	Rabbit
IL-7	Abcam	Ab9732	Rabbit
STAT3	Cell Singaling Technologies	9145	Rabbit
P-STAT3	Cell Singaling Technologies	4904	Rabbit

Anticuerpo Secundario: Polyclonal Swine anti Rabbit immunoglobulin/HRP Ref. P0399 (Dako®)

