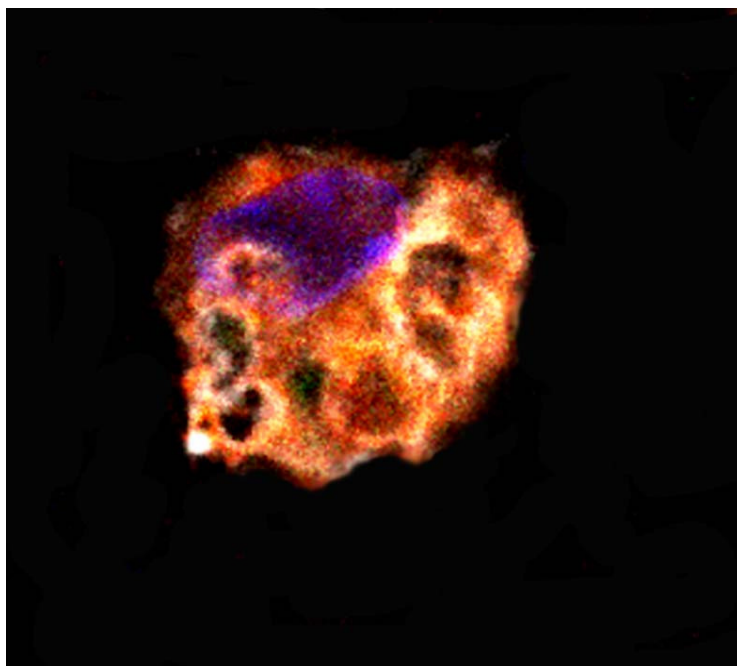


CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS SUPRESORAS DERIVADAS DE MIELOIDES COMO NUEVOS AGENTES INMUNOMODULADORES ENDÓGENOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE



Verónica M^a Moliné Velázquez

El Dr. Fernando de Castro Soubriet, Investigador Principal del Grupo de Neurobiología del Desarrollo-GNDe, y el Dr. Diego Clemente López, Investigador Postdoctoral del Grupo de Neurobiología del Desarrollo-GNDe del Hospital Nacional de Paraplégicos,

AUTORIZAN, la presentación de la Tesis Doctoral titulada: “Caracterización de las Células Supresoras Derivadas de Mieloides como nuevos agentes inmunomoduladores endógenos para el tratamiento de la Esclerosis Múltiple”, realizada por la Lda. Verónica María Moliné Velázquez, bajo nuestra co-dirección y supervisión en el Hospital Nacional de Paraplégicos y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid. Para que así conste, y a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Toledo, a 11 de Marzo de 2013.

Fdo.: Dr. Fernando de Castro Soubriet

Fdo.: Dr. Diego Clemente López

AGRADECIMIENTOS

Por fin este momento ha llegado, finalmente, estoy escribiendo los agradecimientos de mi tesis y, la verdad, me va a resultar difícil recoger en unas pocas líneas a todas las personas que durante estos años han formado parte de mi vida científica y personal, espero no olvidarme de mencionar a nadie.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directores de tesis, el Dr. Fernando de Castro Soubriet, por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio, y al Dr. Diego Clemente López, por ser mi maestro y consejero. Me llevo muy buen recuerdo de todo el tiempo que he trabajado junto a ti. GRACIAS por todo. Te echaré mucho de menos.

A la Dra. Virginia Vila del Sol, responsable del servicio de citometría de flujo del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo, por sus consejos en el campo de la inmunología y la citometría de flujo. Cada vez que vea un *Dot plot* me acordaré de ti Virgi.

Al Dr. José Ángel Rodríguez y al Dr. Javier Mazarío, de la unidad de microscopía y análisis de imagen del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo, por su apoyo técnico al frente del microscopio confocal. Gracias por ayudarme y enseñarme en todo momento.

A la Dra. Carmen Espejo, del grupo de Neuroinmunología Clínica del Instituto de Recerca del Hospital Universitario Vall d'Hebron (HUVH) de Barcelona, por su ayuda para perfeccionar la técnica de inmunización a los ratones.

Al Dr. Augusto Silva, del Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC de Madrid, por ceder amablemente al laboratorio la Glicoproteína Oligodendrocítica de la Mielina (MOG).

Al Dr. Alfredo Maqueda, del grupo de Neurología Molecular del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo, por brindarme su experiencia y enseñarme a realizar el gradiente de Percoll.

A todos mis compañeros de laboratorio, con los que he compartido tan buenos momentos durante estos años. A Isabel Machín, Iris Sánchez, Rafael Lebrón, Eva Medina, Diego García, Verónica Murcia, Cristina Ortega, Ana Bribián, Pedro Esteban. Además de los compañeros que ya no están en el laboratorio: Laura García, Amelia Sánchez (Mely), Javi

Arenzana y Jacinto Sarmentero. Gracias a todos por vuestro compañerismo, por echarme una mano cada vez que lo he necesitado y, lo más importante, por alegrar mi día a día en el laboratorio con vuestras risas y chascarrillos. Ha sido una suerte tener unos compañeros como vosotros.

A todas las personas que fuera del laboratorio me han brindado su amistad y han estado ahí para apoyarme: Ricardo, Luis, Sandra, Pablo (el nene), Soraya, Míriam, Juan, Elena, Desiré y Francesca (Paki), nunca olvidaré todo lo que he vivido junto a vosotros. Las tardes de cervecitas y/o vinos, las cenas de chicas, las sesiones de cine y los viajes han sido inolvidables para mí, y el trampolín para desconectar. GRACIAS por darme vuestra amistad y afecto en los malos momentos.

A mis amigas granaínas: Barbara, Noemí, Elena, Lucía y Manoli, por hacer que no olvide las tapas, el “pescaíto” frito de los Diamantes, la marcha granaína y las playas de Almuñécar. Pero sobre todo, GRACIAS por no olvidaros de mí en todo este tiempo, por acogerme siempre con cariño y con una sonrisa cuando he “bajao a Graná”.

Por último, quiero dar las gracias a las personas más importantes de mi vida, mis padres y mi hermano, por estar siempre a mi lado a pesar de la distancia y por enseñarme a luchar por lo que quiero. Sois un ejemplo a seguir, siempre luchando y trabajando para salir adelante a pesar de todas las dificultades. Gracias a vosotros he sacado las fuerzas suficientes para finalizar esta tesis, que también es vuestra.

A mis padres y a mi hermano

ABREVIATURAS

APC: Célula Presentadora del Antígeno

Arg-I: Enzima Arginasa-I

ATRA: Ácido Retinoico Todo-trans

BCL2: Proteína Anti-apoptótica "*B-cell lymphoma 2*"

BHE: Barrera Hematoencefálica

BSA: Albúmina de Suero Bovino

CAT: Transportadores Catiónicos de Aminoácidos

CFA: Adyuvante Completo de Freund

CMC: Carboximetilcelulosa

CRABP: Proteínas Celulares de Unión a Ácido Retinoico

CTLA-4: Antígeno Linfocítico Cytotóxico 4

CXCR: Receptor de la quimioquina CXC

DAB: Diaminobencidina

DC: Célula Dendrítica

Dpi: Días post-inmunización

EAE: Encefalitis Autoinmune Experimental

EC: Eriocromo Cianina

EM: Esclerosis Múltiple

EM-PP: Esclerosis Múltiple-Primaria Progresiva

EM-PR: Esclerosis Múltiple-Progresiva Recurrente

EM-RR: Esclerosis Múltiple-Recurrente Remitente

EM-SP: Esclerosis Múltiple-Secundaria Progresiva

FGF: Factor de Crecimiento Fibroblástico

FITC: Isocianato de Fluoresceína

Foxp3: Factor de Transcripción *Forkhead box P3*

FSC: Dispersión Frontal de la Luz

GCs: Guanilato Ciclasa soluble

GMPc: Guanosina 3'5' Monofosfato cíclica

GM-CSF: Factor de Estimulación de Colonias de Granulocitos-Macrófagos

HLA: Antígeno de Histocompatibilidad Leucocitario Humano

IFN: Interferón

IL: Interleuquina

IMC: Célula Mieloide Inmadura

iNOS: Enzima Óxido Nítrico Sintasa Inducible

IAP: Genes Inhibidores de la Apoptosis

LCR: Líquido Cefalorraquídeo

LPS: Lipopolisacárido

MBP: Proteína Básica de la Mielina

M-CSF: Factor de Estimulación de Colonias de Macrófagos

M-CSFR: Receptor del M-CSF (CD115)

MDSC: Célula Supresora Derivada de Mieloides

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad

MOG: Glicoproteína Oligodendrocítica de la Mielina

NK: Célula Natural Killer

ON: Óxido Nítrico

PB: Pacific Blue

PB 0,1M: Tampón Fosfato 0,1 M y pH 7,4

PBS: Tampón Bifosfato Salino 1X y pH 7,4

PE: Ficoeritrina

PerCP: Proteína Clorofílica de *Peridinium*

PFA: Paraformaldehído

PI3K: Fosfoinositol 3-quinasa

PLP: Proteína Proteolipídica

RAR: Receptores del Ácido Retinoico

RARE: Elementos de Respuesta al Ácido Retinoico

ROR: Receptor Nuclear Huérfano relacionado con el Ácido Retinoico

ROS: Especies Reactivas del Oxígeno

RXR: Receptores X de Retinoides

SBF: Suero Bovino Fetal

SEM: Error estándar de la media

SIP: Stock iso-osmótico de Percoll

SNB: Suero Normal de Burro

SNC: Sistema Nervioso Central

SSC: Dispersión octogonal de la luz

STAT: Señal de Activación de la Transcripción y de la Traducción

TA: Temperatura Ambiente

TCR: Receptor de la célula T

TGF: Factor de Crecimiento Transformante

Th: Linfocito T helper o cooperador

TIM3: proteína de la inmunoglobulina y mucina 3 de la célula T

TLR: Receptor Tipo Toll

TMEV-IDD: Encefalomiелitis Murina Inducida por el Virus de Theiler

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

Treg: Células T reguladoras

Tris: Tris-HCl 0,1M y pH 7,6

TSA: Antígenos Específicos de Tejido

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Esclerosis Múltiple	3
Anatomía patológica de la Esclerosis Múltiple	3
Formas clínicas evolutivas de la Esclerosis Múltiple	4
Respuesta autoinmune en Esclerosis Múltiple	6
2. Modelos animales en Esclerosis Múltiple	7
Encefalitis Autoinmune Experimental	7
3. Inmunomodulación en la Esclerosis Múltiple y en la Encefalitis Autoinmune Experimental	9
Células inmunes implicadas en la inmunomodulación de la Esclerosis Múltiple y de la EAE	10
Inmunomodulación mediante la apoptosis del linfocito T en la Esclerosis Múltiple y en la EAE	11
4. Células Supresoras Derivadas de Mieloides	13
Origen de las Células Supresoras Derivadas de Mieloides	13
Identificación de las Células Supresoras Derivadas de Mieloides	15
Mecanismos de inmunosupresión de las Células Supresoras Derivadas de Mieloides	16
Implicación de las Células Supresoras Derivadas de Mieloides en cáncer y trasplantes.....	19
Células Supresoras Derivadas de Mieloides en EAE.....	21
Tratamientos moduladores de las Células Supresoras Derivadas de Mieloides	23
5. Ácido retinoico	24
Uso terapéutico del ATRA	24
Ácido retinoico sintético (Am80)	26
Am80 como terapia anti-inflamatoria en EAE.....	26
 HIPÓTESIS DE TRABAJO	 29
 OBJETIVOS	 33
 MATERIAL Y MÉTODOS	 37
1. Inducción de la EAE	39
Número de animales y periodos experimentales estudiados	39
Procedimiento de la inmunización	40
2. Tratamiento de Am80 mediante sonda oral	42
3. Procesado del tejido para histología	44
Fijación del tejido mediante perfusión intracardiaca.....	44
Postfijación del tejido mediante inmersión	45
Crioprotección y congelación del tejido	45
4. Tinción para mielina	45
5. Inmunohistoquímica con DAB	46
6. Inmunofluorescencia	47
7. Técnica de detección de apoptosis	47
8. Procesado del bazo para citometría de flujo	49
9. Inmunocitoquímica para el análisis de las poblaciones celulares procedentes del bazo	50
10. Aislamiento y estimulación de los linfocitos T procedentes del bazo	51
11. Obtención de células infiltradas de las médulas espinales y separación por citometría de flujo de las Células Supresoras Derivadas de Mieloides	52
12. Co-cultivo de linfocitos T y de Células Supresoras Derivadas de Mieloides	55
13. Análisis cuantitativo del tejido	56
14. Análisis de citometría de flujo	57
15. Análisis estadístico	57
 RESULTADOS	 59
A. Caracterización de las Células Supresoras Derivadas de Mieloides en el modelo de EAE	61
Presencia de células Arginasa-I en la médula espinal de ratones con EAE.....	61
Distribución espacio-temporal de las células Arginasa-I en la EAE	63
Las células Arginasa-I presentan características de Células Supresoras Derivadas de Mieloides	65
Expresión de iNOS en las Células Supresoras Derivadas de Mieloides	72

La presencia de las células Arginasa-I está asociada con la apoptosis de los linfocitos T	74
B. Modulación de la población de Celulas Supresoras Derivadas de Mieloides mediante el tratamiento con Am80	83
El tratamiento con Am80 impide la supresión de la respuesta autoinmune en el curso clínico de la EAE	83
Am80 induce un aumento en el porcentaje de linfocitos T en el bazo de los ratones con EAE.....	85
Am80 induce la disminución de la población de Células Supresoras Derivadas de Mieloides y la acumulación de neutrófilos en el bazo de los ratones con EAE	89
Am80 incrementa la densidad de granulocitos infiltrados en la médula espinal de los ratones con EAE.....	91
Am80 induce un aumento de la densidad de las células mieloides totales en la médula espinal de los ratones con EAE.....	97
Am80 promueve la apoptosis de las Células Supresoras Derivadas de Mieloides en la médula espinal de los ratones con EAE.....	99
Am80 incrementa la densidad de linfocitos T CD4 en la médula espinal de los ratones con EAE	102
DISCUSIÓN	105
I. Caracterización de las Células Supresoras Derivadas de Mieloides en la EAE	107
II. Modulación de las Células Supresoras Derivadas de Mieloides endógenas	114
III. Implicaciones terapéuticas de las Células Supresoras Derivadas de Mieloides como futuros agentes terapéuticos en la Esclerosis Múltiple	120
CONCLUSIONES	123
BIBLIOGRAFÍA	127

INTRODUCCIÓN

1. Esclerosis Múltiple

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad crónica, autoinmune y desmielinizante del sistema nervioso central (SNC), siendo la principal causa de disfunción neurológica en adultos jóvenes (Inglese, 2006; Frohman et al., 2006; Compston y Coles, 2008). Al igual que en otras enfermedades autoinmunes, en la EM los estudios epidemiológicos demuestran que la susceptibilidad a padecer la enfermedad es mayor en las mujeres (razón 3:1) que en los hombres (Alonso y Hernán, 2008), y que el pico de incidencia ocurre durante la edad fértil, entre los 20-40 años. En cambio, cuando la enfermedad debuta entre los 45 y 50 años, coincidiendo con la edad de la menopausia donde los niveles de estrógenos disminuyen, la incidencia se iguala en ambos sexos (Morale et al., 2001; de Andrés, 2003).

Anatomía patológica de la Esclerosis Múltiple

Desde un punto de vista anatomopatológico, la EM se caracteriza por presentar lesiones o placas desmielinizadas localizadas en la sustancia blanca del SNC. Las lesiones se clasifican según las alteraciones observadas en el infiltrado celular inflamatorio, que está compuesto por linfocitos (T y B) y macrófagos activados, junto a la presencia o no de daño axonal y de gliosis (Frohman et al., 2006).

Lesión desmielinizante activa

La lesión activa se define por la presencia de un infiltrado inflamatorio perivascular y bordes mal definidos. La lesión suele ser de pequeño tamaño, centrada en el vaso con un infiltrado de células inflamatorias compuesto de linfocitos y también de macrófagos que pueden entrar al parénquima, aunque con menor densidad, y con un claro gradiente desde el vaso sanguíneo a la periferia. En la lesión se observa pérdida de mielina y destrucción axonal. Aunque también pueden observarse algunos axones que todavía conservan la vaina de mielina o que han sido parcialmente remielinizados.

Lesión desmielinizante crónico-activa

La placa crónico-activa se caracteriza por tener los bordes (conocidos como periplaca) bien delimitados, y en ellos se observan abundantes linfocitos, acumulación de precursores de oligodendrocitos y macrófagos cargados de restos de mielina. En cambio, el centro de la lesión tiene pocos infiltrados y los axones que la atraviesan están desnudos, sin vaina mielina que los cubra. No se observan infiltrados inflamatorios perivasculares, aunque es posible encontrar escasos linfocitos y macrófagos en el parénquima. La desmielinización y la pérdida axonal es completa, salvo en la periplaca, donde se puede observar cierta remielinización parcial.

Lesión desmielinizante crónico-inactiva

Esta placa suele ser extensa y confluir con otras placas vecinas. Presenta desmielinización completa, escasa densidad de axones con su vaina de mielina, y ausencia de precursores de oligodendrocitos. El borde de la placa está muy bien delimitado y no presenta remielinización en el centro ni en la periplaca. La placa está ocupada, en su mayor parte, por astrocitos, por lo que se denomina también placa gliótica.

Lesión “en sombra”

En ellas no hay infiltrados inflamatorios y presentan remielinización incompleta en el interior de la lesión. Los bordes están bien definidos, la densidad de los axones está reducida y no hay gliosis. En cuanto al grado de remielinización de este tipo de placas, hay una gran variabilidad entre pacientes, lo que indica que la capacidad de regeneración es variable para cada individuo.

Formas clínicas evolutivas de la Esclerosis Múltiple

La EM presenta cuatro variantes clínicas o formas evolutivas diferentes (Fig. 1). La mayoría de los pacientes (85% de los casos), presentan inicialmente un curso recurrente-remitente (EM-RR), caracterizado por presentar episodios o brotes entre periodos de estabilidad sintomatológica. Los brotes se caracterizan por presentar un periodo inicial de manifestación de los síntomas neurológicos (periodo recurrente), seguido de un periodo de

recuperación parcial o total de los síntomas (periodo de remitencia). Esta variante es más frecuente en mujeres con una edad entre los 20-35 años y presenta altos niveles de marcadores inflamatorios (Inglese, 2006; Trapp y Nave, 2008; Zuvich et al., 2009).

La mayoría de los pacientes con EM no tratados que presentan la variante clínica recurrente-remitente evolucionan, en un periodo de 25 años, a un curso clínico de EM denominada secundaria progresiva (EM-SP). La EM-SP se caracteriza por presentar un incremento crónico y progresivo de los síntomas, sin periodos de recuperación. Solamente el 10-15% de los pacientes con EM presentan un curso de la enfermedad en el que predomina un avance crónico y sin remisión desde el principio de los síntomas, que se denomina EM-primaria progresiva (EM-PP; Inglese, 2006; Trapp y Nave, 2008; Zuvich et al., 2009). Al contrario que en la EM-RR, la EM-PP afecta por igual tanto a hombres como a mujeres, se inicia en personas mayores de 40 años, exhibe bajos niveles de marcadores inflamatorios y no responde a las terapias inmunomoduladoras. Otra forma evolutiva de EM es la progresiva recurrente (EM-PR), que se define por presentar una evolución crónica neurológica constante desde el inicio de los primeros síntomas con episodios o brotes superpuestos (Inglese, 2006; Trapp y Nave, 2008; Zuvich et al., 2009).

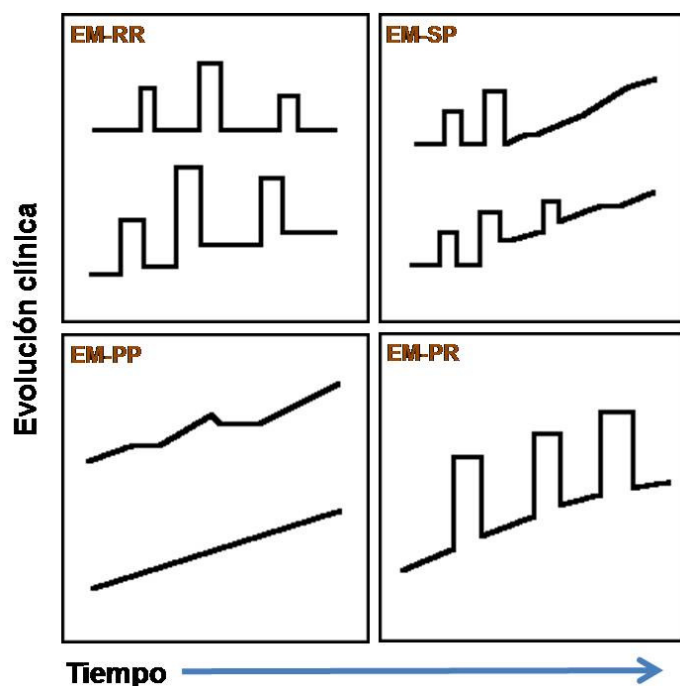


Figura 1: Formas clínicas evolutivas de la esclerosis múltiple. En la EM se pueden identificar cuatro formas clínicas principales de evolución: a) la EM-RR caracterizada por presentar periodos de recurrencia entre periodos de recuperación; b) la EM-SP que presenta un curso inicial recurrente-remitente y evoluciona en el tiempo a un curso crónico de EM progresivo en el tiempo; c) la EM-PR y la EM-PP que presentan desde el inicio una evolución clínica progresiva en el tiempo. Modificada de: Zuvich et al., 2009.

Respuesta autoinmune en Esclerosis Múltiple

El fracaso del sistema inmune para mantener la auto-tolerancia contra antígenos propios (auto-antígenos), denominados también antígenos específicos de tejido (TSA, del inglés *Tissue-Specific Antigens*), da lugar a una respuesta autoinmune perjudicial para el organismo (Szczepanik, 2011; Gonsette, 2012). El mecanismo exacto de la activación inicial de los linfocitos T autorreactivos y su reactivación durante los brotes clínicos es aún desconocido. Hay autores que defienden que la EM se iniciaría debido a una alteración primaria y/o daño sobre la capacidad de mielinización del oligodendrocito, seguida de una respuesta autoinmune secundaria a la desmielinización observada (Becher et al., 2000; Lucchinetti et al., 2000; Bailey et al., 2007).

Por el contrario, hay autores que postulan que la respuesta autoinmune ocurre fuera del SNC ya que las células nerviosas presentan una baja expresión de moléculas HLA (del inglés *histocompatibility leukocyte antigen*) -I y II, necesarias para la presentación del auto-antígeno (Cassan et al., 2009), y debido a la existencia de factores solubles en el líquido cefalorraquídeo (LCR) capaces de neutralizar o contrarrestar el efecto de determinadas citocinas pro-inflamatorias (Harris y Fabry, 2012). Además, hay autores que postulan que es necesaria la activación del linfocito T para que éste pueda cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) y entrar al SNC (Goverman, 2009; Goverman, 2011). Los principales mecanismos propuestos para explicar cómo ocurre la activación del linfocito T autorreactivo fuera del SNC podrían ser: a) el mimetismo molecular, es decir, la activación de los linfocitos T por reactividad cruzada entre antígenos propios y agentes extraños a causa de una infección; b) la activación de los linfocitos T por un proceso inflamatorio inespecífico que se produce durante las infecciones; c) la combinación de ambos mecanismos (Sospedra y Martin, 2005).

También se ha postulado que, como consecuencia de una afectación inicial dentro del SNC, se produciría una salida del antígeno a través de ciertos nervios craneales, principalmente por los nervios olfatorios, hacia los ganglios linfáticos cervicales, donde se

realizaría la presentación del auto-antígeno a los linfocitos T autorreactivos, además, el porcentaje de dichas células en los ganglios linfáticos cervicales se correlaciona directamente con el daño neurológico (Van et al., 2009a; Van et al., 2009b).

2. Modelos animales en Esclerosis Múltiple

La investigación de la EM se beneficia, sin duda, del desarrollo de modelos animales. Son dos los principales modelos utilizados para su estudio: los modelos virales y los modelos autoinmunes.

Los modelos virales atienden a la teoría de un posible origen viral de la EM. El más extendido es la enfermedad desmielinizante inducida por la infección con el virus de Theiler (TMEV-IDD, del inglés *Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus-Induced Demyelinated Disease*; Nelson et al., 2004). El modelo de TMEV-IDD es usado para investigar cómo una infección viral puede inducir una respuesta autoinmune en el SNC ya que, después de la inoculación intratecal del virus, se desarrolla una respuesta inflamatoria, desmielinización y, finalmente, se dañan los axones en el SNC. El curso clínico que se desarrolla en este modelo atiende a un curso crónico primario progresivo de EM (Tsunoda y Fujinami, 2010). Aunque el modelo animal más utilizado para el estudio de la EM es la Encefalitis Autoinmune Experimental (EAE; Nelson et al., 2004; Gold et al., 2006; Constantinescu et al., 2011). Este modelo es considerado el más apropiado para estudiar el componente autoinmune de la EM, ya que se induce en él una respuesta inmune sin involucrar a virus o sustancias tóxicas, como la cuprizona (Batoulis et al., 2011).

Encefalitis Autoinmune Experimental

Este modelo se basa en la reacción autoinmune frente a la mielina que se desarrolla tras la inducción activa o pasiva de la enfermedad. La inducción activa de la EAE se realiza mediante la inmunización con fragmentos de proteínas de la mielina (neuroantígenos). En cambio, la inducción pasiva se realiza mediante la transferencia de linfocitos T

autorreactivos frente a epítomos de la mielina (Nelson et al., 2004; Gold et al., 2006; Constantinescu et al., 2011).

Como neuroantígenos se han utilizado homogenados del SNC, proteínas de la mielina y secuencias incompletas de péptidos de la mielina (Batoulis et al., 2011). La identificación de la glicoproteína oligodendrocítica de la mielina (MOG, del inglés *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*) como neuroantígeno clave, supuso un progreso sustancial en la reproducción de la patología del curso clínico de la EM (Moreno et al., 2012). Esto es debido a que la inducción de la EAE con MOG produce no sólo la inducción de linfocitos T autorreactivos en las especies genéticamente susceptibles sino que, además, induce una respuesta desmielinizante dependiente de la producción de auto-anticuerpos (Storch et al., 1998). Además de la MOG, la proteína proteolipídica (PLP, del inglés *Proteolipid Protein*) y la proteína básica de la mielina (MBP, del inglés *Myelin Basic Protein*) han sido también empleadas para la inducción de la EAE (Pettinelli et al., 1982; Tuohy et al., 1988).

Aunque el modelo de EAE en ratón fue descrito en 1950, su utilidad se vio limitada por una menor incidencia de la enfermedad y su heterogeneidad. Este problema fue resuelto después de la introducción en el modelo de dos componentes esenciales: a) el adyuvante completo de Freund (CFA, del inglés *Complete Freund's Adjuvant*) o el adyuvante incompleto de Freund suplementado con una concentración determinada de *Mycobacterium tuberculosis*, que activa el sistema inmunológico y facilita la sensibilización al neuroantígeno (Libbey et al., 2010); b) la administración de la toxina pertúsica, que permeabiliza la BHE, facilitando la activación de las células presentadoras del antígeno (APCs, del inglés *Antigen Presenting Cells*) y el reconocimiento del antígeno de mielina por los linfocitos T activados que entran en el SNC (Hofstetter et al., 2002; Hofstetter et al., 2007).

Tipos de cursos clínicos de la EAE:

La progresión de la EAE va a depender de la especie y/o de la cepa de animal, así como del antígeno empleado y el protocolo de inmunización, generando un curso monofásico, crónico o remitente-recurrente (Gold et al., 2006; Batoulis et al., 2011). Así, la EAE inducida por MBP en las cepas B10.PL y PL/J de ratones es monofásica: el animal se

recupera totalmente después de sufrir un episodio recurrente-remitente breve (Waxman et al., 1980). En ratones de la cepa SJL, la inducción de la EAE mediante la inmunización con PLP induce un curso crónico recurrente (Hofstetter et al., 2002). En cambio, la inmunización con la secuencia 35-55 de la proteína MOG (MOG₃₅₋₅₅) en ratones de la cepa C57BL/6 puede producir un curso clínico recurrente-remitente, monofásico o multifásico, y/o un curso clínico crónico, dependiendo de la concentración empleada del antígeno, de *Mycobacterium tuberculosis* en el adyuvante y de la toxina pertúsica (Berard et al., 2010).

Respuesta autoinmune en la EAE:

Por término general, los primeros signos clínicos de la EAE son observados a los 9-12 días después de la inmunización (días post-inmunización: dpi) del antígeno o de los linfocitos T específicos para la mielina; y aproximadamente 5 o 6 dpi después, se alcanza el pico máximo de discapacidad clínica. Esto es debido a que, después de la inmunización subcutánea, se produce una fase de sensibilización en los órganos linfoides donde los linfocitos T CD4 reconocen el antígeno, lo que origina que estas células proliferen, se diferencien y produzcan citoquinas. Después de 5 a 10 dpi, los nuevos linfocitos T CD4 efectores generados en el órgano linfoide se diseminan por todo el organismo, llegando en gran cantidad al espacio peritoneal y, en menor medida, también al SNC, donde se inicia la fase efectora de la EAE. En esta fase, el linfocito T CD4 activado encuentra el antígeno endógeno y, como consecuencia, se produce el reclutamiento de otras células inmunes al SNC, lo que genera el inicio de los primeros síntomas clínicos, que alcanzan su pico máximo varios días después (Targoni et al., 2001).

3. Inmunomodulación en la Esclerosis Múltiple y en la EAE.

La respuesta inmune después de su estimulación por el antígeno declina con el paso del tiempo, volviendo al estado basal de reposo o de equilibrio inmunológico (homeostasis; Abbas, 2008). La regulación de la respuesta inmune (inmunomodulación) para mantenimiento de la homeostasis inmunológica depende de la capacidad de todos sus

componentes de resolver eficazmente una respuesta inmune inapropiada (Szczepanik, 2011; Gonsette, 2012). Así, en la EM y su modelo animal es esencial el estudio de las diversas poblaciones de células inmunes (Gonsette, 2012) y de los mecanismos de tolerancia periférica, entre ellos, la apoptosis del linfocito T (Pender et al., 2001).

Células inmunes implicadas en la inmunomodulación de la Esclerosis Múltiple y de la EAE

Durante mucho tiempo se consideró que los linfocitos T colaboradores o *helper* (Th) 1 y 2 eran los principales causantes de la inmunomodulación durante la patogénia de la EM (Batoulis et al., 2010). De este modo, el aumento de la actividad clínica de la EM se correlacionaba con la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (Th1): Interferón (IFN) γ , interleuquina (IL) 12 y TNF (del inglés *Tumoral Necrosis Factor*) α en el SNC y en el LCR de los pacientes, mientras que la remisión de los síntomas clínicos se asociaba a las citoquinas anti-inflamatorias (Th2): IL-4, IL-5, IL-13 e IL-25 (Heeger et al., 2000; Kuchroo et al., 2002; Gutcher et al., 2007; Fitzgerald et al., 2007). Además, algunos fármacos que favorecen la respuesta Th2, como el acetato de glatirámico o el IFN β , tienen efectos beneficiosos en los pacientes con EM (Oreja-Guevara et al., 2012). Sin embargo, considerar únicamente el balance entre los linfocitos Th1 y Th2 como concepto de inducción *versus* protección del daño tisular en la EM es una simplificación excesiva (Dent, 2002). En la EM, los linfocitos Th2 no sólo participan en el proceso de inmunosupresión de la respuesta autoinmune, sino que también tienen funciones patogénicas en el desarrollo de la enfermedad. Tanto el IFN γ como la IL-4 están en concentraciones elevadas en el suero de pacientes con EM durante el periodo de incremento de la sintomatología, lo que implica la activación simultánea de ambas subpoblaciones de linfocitos Th1 y Th2 (Steimann, 2007). Tanto en la EAE como en la EM, la polarización a linfocitos Th2 se relaciona con la producción de auto-anticuerpos que favorecen la respuesta autoinmune debido a la activación de las células B (Steimann, 2007). Por otro lado, diversos trabajos muestran que en las diferentes etapas de la EM y de

la EAE participan numerosas poblaciones de células inmunes que regulan la respuesta inmune, ya sea estimulándola o suprimiéndola (Tabla 1).

Tabla 1: Células inmunes implicadas en la patogenia e inmunosupresión de la Esclerosis Múltiple y de la EAE.

CÉLULA EFECTORA	CONTRIBUCIÓN EN LA PATOGENIA DE LA EM Y LA EAE	REFERENCIAS
Linfocitos T CD4⁺/Th17	Secreción de citoquinas pro-inflamatorias (patogénicas)	Matusevicius et al., 1999 Lock et al., 2002 Tzartos et al., 2008 Aranami y Yamamura, 2008 Durelli et al., 2009 Langrish et al., 2005 Korn et al., 2009
Linfocitos T CD4⁺ CD25⁺/FoxP3 (células T reguladoras; Treg)	Supresión de los linfocitos T autorreactivos mediante la liberación de TGFβ e IL-10 o mediante contacto celular directo (inmunosupresoras)	Huan et al., 2005 Venken et al., 2006 Astier et al., 2006 Venken et al., 2008 Martínez-Forero et al., 2008 McGeachy et al., 2005 Korn et al., 2007
Linfocitos T CD8⁺	Actúan como células efectoras produciendo citoquinas pro-inflamatorias (patogénicas) o como células Treg (inmunosupresoras)	Babbe et al., 2000 Skulina et al., 2004 Jilek et al., 2007 Junker et al., 2007
Células B	Secreción de anticuerpos y presentación del antígeno (patogénicas). Producen citoquinas anti-inflamatorias e inducen a las células Treg (inmunosupresoras)	Lucchinetti et al., 2000 Krumbholz et al., 2012 Fillatreau et al., 2012 Mann et al., 2007 Matsushita et al., 2010
Células Natural Killer (NK)	Inmunosupresoras (expresión alta en ellas de CD56) y patogénicas (expresión moderada de CD56)	Takahashi et al., 2001 Cooper et al., 2001 Takahashi et al., 2004 Arias et al., 2008
Células Dendríticas (DCs)	APCs (patogénicas), producción de IL-4, IL-10 y TGFα (inmunosupresoras)	Dillon et al., 2006 Deshpande et al., 2007 Lamonier et al., 2007 Li et al., 2008 Zozulya et al., 2010
Macrófagos	Propiedades patogénicas (macrófagos de activación clásica: M1) e inmunosupresoras (macrófagos de activación alternativa: M2) Expresión de FGF-2 (asociado a la remielinización de la lesión).	Werner et al., 2001 Mikita et al., 2011 Clemente et al., 2011

FoxP3 (del inglés *Factor de transcripción forkhead box P3*); TGF (del inglés *Transforming growth factor*); FGF (del inglés *Fibroblastic growth factor*); DC (del inglés *Dendritic Cell*).

Inmunomodulación mediante la apoptosis del linfocito T en la Esclerosis Múltiple y en la EAE

La apoptosis es la forma más común de muerte celular fisiológica. Es un proceso vital importante durante toda la vida del organismo y ayuda a mantener la homeostasis del tejido (Lockshin y Williams, 1965). Cuando en el organismo no se produce este mecanismo regulador de manera efectiva puede dar lugar a enfermedades como el cáncer o enfermedades autoinmunes; aunque una apoptosis exagerada también puede tener efectos negativos para el organismo, como ocurre en el SIDA (Thompson, 1995).

Diversos estudios muestran cómo los linfocitos T apoptóticos promueven la tolerancia inmune, no sólo debido a su eliminación del organismo, sino también debido a otros mecanismos. Precisamente, los linfocitos T apoptóticos tienen la capacidad de producir IL-10 y TGF β , inhibiendo en los macrófagos y las DCs la producción de citoquinas pro-inflamatorias y favoreciendo en ellas la producción de citoquinas anti-inflamatorias (Fadok et al., 1998; Chen et al., 2001; Stuart et al., 2002; Albert, 2004). Además, la fagocitosis del linfocito T apoptótico por las DCs promueve que éstas últimas funcionen como células reguladoras, induciendo la tolerancia al auto-antígeno y promoviendo a las células Treg (Heath y Carbone, 2001; Li et al., 2006). Es por todo ello que la apoptosis del linfocito T autorreactivo es considerada un mecanismo de regulación de la respuesta autoinmune (Walker y Abbas, 2002).

En la EM, la apoptosis del linfocito T se ha considerado un mecanismo de gran importancia para la remisión de la enfermedad, ya que los pacientes con EM presentan defectos en los mecanismos de apoptosis del linfocito T que no es observado en los individuos sanos (Wekerle et al., 1986; Hickey et al., 1991). De hecho, los pacientes con EM presentan en sus linfocitos T una elevada expresión de genes inhibidores de la apoptosis (IAP, del inglés *Inhibitors of Apoptosis*) en comparación con los sujetos control (Segal y Cross, 2000; Semra et al., 2002; Sharief et al., 2002). De este modo, la supervivencia del linfocito T autorreactivo en el parénquima del SNC en los pacientes con EM es determinante para que se desarrolle la respuesta autoinmune y, además, se inicie el reclutamiento de otras células inflamatorias hacia el mismo (Pender, 1998; Pender et al., 2000). Además, la apoptosis del linfocito T en el interior del parénquima del SNC en la fase de mayor actividad sintomatológica de la EAE, junto con la relativa falta de proliferación de este en el interior de la lesión, se ha asociado con la recuperación espontánea de los signos clínicos (Pender et al., 1991; Pender et al., 1992; Ohmori et al., 1992; Schmied et al., 1993; Bauer et al., 1998; Pender y Rist, 2001).

4. Células Supresoras Derivadas de Mieloides

Las Células Supresoras Derivadas de Mieloides (MDSCs, del inglés *Myeloid-Derived Suppressor Cells*) son una población celular de naturaleza mielóide inmadura con propiedades inmunosupresoras que inducen *de novo* a las células Treg y, además, promueven la apoptosis del linfocito T. Las MDSCs fueron descritas inicialmente en pacientes con cáncer (Buessow et al., 1984; Young et al., 1987; Seung et al., 1995), aunque también participan en otras patologías como en la sepsis por infección parasitaria y en trasplantes (Goñi et al., 2002; Makarenkova et al., 2006; Delano et al., 2007; Talmadge, 2007). Durante décadas, las MDSCs han sido denominadas, entre otras formas, como células naturales supresoras o células mieloides inmaduras (IMCs, del inglés *Inmature Myeloid Cells*; Cuenca et al., 2011). La acumulación de MDSCs en pacientes con cáncer contribuye al desarrollo de la enfermedad debido a varios factores: a) por sus propiedades inmunosupresoras, que limitan la respuesta de los linfocitos T; b) por su capacidad de promover tanto la angiogénesis dentro del tumor como la metastásis del mismo (Murdoch et al., 2008). Además de su participación en promover la tolerancia al rechazo en trasplantes de corazón (Murdoch et al., 2008; Boros et al., 2010; García et al., 2010), recientemente, las MDSCs han cobrado gran importancia en la regulación de la respuesta autoinmune (Zhu et al., 2007; King et al., 2009; Yin et al., 2010; Zhu et al., 2011; Ioannou et al., 2012).

Origen de las Células Supresoras Derivadas de Mieloides

En condiciones normales, durante la mielopoyesis, las células pluripotenciales hematopoyéticas de la médula ósea se diferencian a células mieloides progenitoras y, a su vez, éstas se diferencian a IMCs (Fig. 2; Young et al., 1987). Finalmente, las IMCs migran a los diferentes órganos periféricos, donde se diferencian rápidamente y dan lugar a macrófagos, DCs o granulocitos (Gabilovich y Nagaraj, 2009).

La mielopoyesis es controlada por una compleja red de factores solubles, entre los que se encuentran el factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-

CSF, del inglés *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*), el factor de estimulación de colonias de macrófagos (M-CSF, del inglés *Macrophage Colony-Stimulating Factor*) y la IL-3 (Apolloni et al., 2000; Bronte et al., 2000).

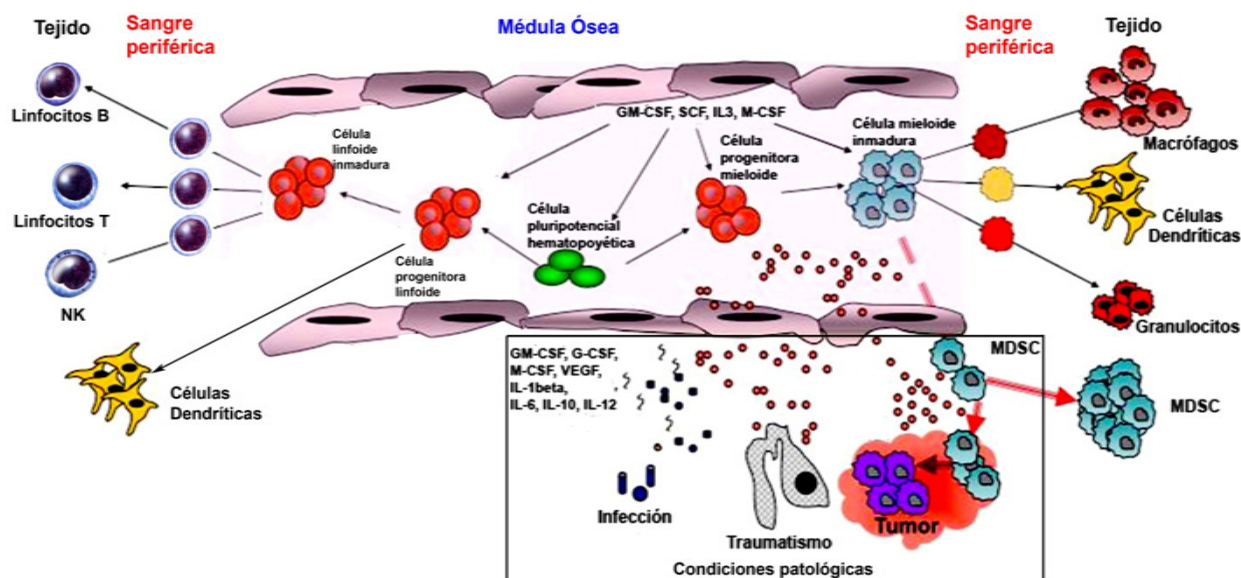


Figura 2: Origen de las Células Supresoras Derivadas de Mieloides. Mediante el proceso normal de mielopoyesis, las células pluripotentes hematopoyéticas migran a los órganos periféricos y maduran a linfocitos (B, T y NK), macrófagos, DCs y granulocitos. Sin embargo, bajo condiciones patológicas (enmarcado), la mielopoyesis se bloquea parcialmente y las células mieloides inmaduras son atraídas al foco patogénico, donde son denominadas MDSCs. Modificada de: Abbas, 2008; Gabrilovich y Nagaraj, 2009.

Sin embargo, en condiciones patológicas, como en cáncer, infecciones parasitarias, y en enfermedades autoinmunes, además de en el trasplante de médula ósea, hay un bloqueo parcial de la diferenciación de las IMCs a células mieloides maduras (Fig. 2). Esto es debido a la producción de los factores solubles M-CSF, GM-CSF o de ILs fuera de la médula ósea que da como resultado la expansión de las IMCs y a la activación en ellas de diversos mecanismos inmunosupresores, que permite clasificarlas como MDSCs. Dichos mecanismos son: a) la expresión de la enzima Arginasa-I (Arg-I); b) la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS); c) la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) y de peroxinitritos (Bronte y Zanovello, 2005; Highfill et al., 2010).

Identificación de las Células Supresoras Derivadas de Mieloides

Las MDSCs son una población heterogénea de células mieloides que presentan características intermedias entre granulocito y macrófago (Youn et al., 2008). En ratón, las MDSCs se caracterizan por la expresión de los antígenos del linaje mieloides Gr-1 y CD11b (Kusmartsev et al., 2004). Recientemente, la heterogeneidad de la población de MDSCs ha sido descrita con más precisión gracias a los dos epítomos del receptor Gr-1, Ly-6C y Ly-6G, codificados por genes diferentes y que pueden ser detectados de manera separada (Zhu et al., 2007; Movahedi et al., 2008; Youn y Gabrilovich, 2010). El uso de estos dos marcadores de superficie permite la identificación de dos poblaciones de MDSCs diferentes: las MDSCs de naturaleza granulocítica, con fenotipo CD11b⁺/Ly-6C^{low}/Ly-6G⁻ o CD11b⁺/Ly-6C^{int}/Ly-6G⁺, y las MDSCs de naturaleza monocítica, con fenotipo CD11b⁺/Ly-6C^{high}/Ly-6G⁻ (Hestdal et al., 1991; Zhu et al., 2007; Youn et al., 2008). Recientemente, se ha introducido el marcador de superficie CD115, también conocido como el receptor del factor de estimulación de colonias de macrófagos (M-CSFR, del inglés *Macrophage-Colony Stimulating Factor Receptor*), para identificar a las MDSCs de carácter monocítico y con propiedades altamente supresoras (Gallina et al., 2006; Huang et al., 2006).

En humanos las MDSCs han sido estudiadas principalmente en pacientes con cáncer. Estas células han sido identificadas mediante los marcadores CD124 y CD11b, al igual que en ratón, junto con la expresión de CD14 (marcador de monocitos) y de CD15 (marcador de granulocitos), que distingue dos estirpes celulares diferentes: las MDSCs monocíticas (CD14⁺/CD15^{low}) y las MDSCs granulocíticas (CD14^{low}/CD15⁺). Estas dos poblaciones de MDSCs pueden presentar o no una baja expresión de HLA-DR (Schmielau y Finn, 2001; Gimeno y Barquinero, 2011; Dumitru et al., 2012) y, además, expresan el marcador hematopoyético CD33 (Almand et al., 2001; Ochoa et al., 2007; Gimeno y Barquinero, 2011).

Mecanismos de inmunosupresión de las Células Supresoras Derivadas de Mieloides

Las MDSCs tienen la capacidad de regular la respuesta inmune mediante la disminución de la proliferación del linfocito T, la inducción de su apoptosis (Apolloni et al., 2000; Zea et al., 2005; Rodríguez y Ochoa, 2008) y la promoción de la formación *de novo* de células Treg (Huang et al., 2006; Yang et al., 2006a). Los mecanismos de inmunosupresión por los que las MDSCs ejercen la regulación de la respuesta inmune están asociados al control del metabolismo de la L-Arginina (Kusmartsev y Gabrilovich, 2003; Radi, 2004; Rodríguez y Ochoa, 2008).

La L-Arginina es un aminoácido esencial que sirve como sustrato a las enzimas Arg-I e iNOS (Fig. 3). La expresión de la enzima Arg-I en las MDSCs se correlaciona con la expresión de los transportadores de membrana de la L-Arginina (CAT, del inglés *Cationic Amino-acid Transporters*) que introducen el aminoácido al interior de la célula para que sea metabolizado por la enzima Arg-I (Bronte y Zanovello, 2005). La disminución de la L-Arginina produce en los linfocitos T un bloqueo en la expresión de la ciclina D3 lo que a su vez inhibe en ellos la expresión de la cadena ζ de la subunidad CD3 del receptor de la célula T (TCR, del inglés *T Cell Receptor*), principal componente de transducción de señales del TCR (Baniyash, 2004). Esto desencadena la internalización del TCR y la anergia del linfocito T (Zea et al., 2005; Rodríguez y Ochoa, 2008). Además, la disminución de la L-Arginina del medio extracelular induce en el linfocito T una bajada de la producción de IL-2 e IFN γ y evita la expresión de las proteínas que regulan el ciclo celular, entre ellas la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K, del inglés *Phosphoinositide 3-kinase*), que conlleva a la disminución de la capacidad de proliferación de los linfocitos T (Zea et al., 2005; Rodríguez y Ochoa, 2008).

Por otro lado, la metabolización de L-Arginina por la enzima Arg-I una vez que el aminoácido está en el interior de la MDSC produce la formación de Urea y de L-Ornitina, que inhiben a las proteínas quinasas y alteran la traducción de proteínas en el linfocito T. Además, se generan poliaminas con propiedades reparadoras para el tejido y que

disminuyen en los macrófagos la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Zhang et al., 1997; Bogdan, 2001; Lee et al., 2003; Rodríguez y Ochoa, 2008).

La expresión en las MDSCs de la enzima iNOS, al igual que la enzima Arg-I, metaboliza la L-Arginina, provocando su disminución del medio extracelular (Zhang et al., 1997; Bronte y Zanovello, 2005). Sin embargo, la inmunosupresión mediada por la iNOS no está asociada a la internalización del TCR del linfocito T, sino que está asociada a la inhibición de la traducción de proteínas de señalización mediante dos vías: a) de manera directa, a través de la nitrosilación de residuos de cisteína; b) de manera indirecta, mediante la activación de la guanilato ciclasa soluble (GCs) y la guanosina 3'5' monofosfato cíclica (GMPC), que alteran tanto la expresión de la señal del receptor de IL-2 como su síntesis, disminuyendo la proliferación del linfocito T (Zhang et al., 1997; Duhe et al., 1998; Bingisser et al., 1998; Fischer et al., 2001). Además, la metabolización de la L-Arginina por la iNOS en el interior de la MDSC produce óxido nítrico (ON) que afecta a la estabilidad del ARNm para el receptor de IL-12 (Zhang et al., 1997; Mannick et al., 1999; Macphail et al., 2003) y, además, se produce L-Citrulina, que puede dar lugar a daños en la síntesis de proteínas en el linfocito T (Bogdan, 2001; Alderton et al., 2001).

Pero además, las MDSCs tienen la capacidad de expresar conjuntamente ambas enzimas (Arg-I e iNOS). De este modo se genera ON y urea por la actividad de la enzima iNOS y, además, se generan iones superóxido (O_2^-) por la actividad de la enzima Arg-I (Bronte et al., 2003a). La reacción entre ambos productos produce peroxinitritos y, además, se forman ROS (Bronte y zanovello, 2005). Los peroxinitritos son agentes altamente oxidantes que causan daños en la funcionalidad celular (Schopfer et al., 2003; Radi, 2004), ya que son capaces de cruzar rápidamente la membrana plasmática y salir al espacio extracelular, entrando en el interior del linfocito T, por lo que pueden funcionar como mensajeros intra- e intercelulares, modificando la traducción de proteínas por la nitrosilación de los residuos de tirosina, disminuyendo la diferenciación y la proliferación del linfocito T (Schopfer et al., 2003; Radi, 2004). Además, los peroxinitritos favorecen la apoptosis de la célula T debido a que producen la nitración de los canales aniónicos dependientes de voltaje

en la mitocondria, lo cual induce la expresión de la citocromo C oxidasa y genera la activación de la cascada de caspasas en el interior del linfocito T (Aulak et al., 2001).

La producción de ROS está asociada principalmente al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que es originado a partir de la conversión del oxígeno en contacto con los protones del agua. El H_2O_2 se difunde a través de las membranas, siendo otro potencial mensajero intra- e intercelular que afecta a la viabilidad de las células (Reth, 2002). Estudios iniciales en ratones con cáncer inducido mostraron que el H_2O_2 liberado por las MDSCs suprime la expresión de la cadena ζ de la subunidad CD3 del TCR del linfocito T (Otsuji et al., 1996). Además, al igual que los peroxinitritos, el H_2O_2 puede inducir la apoptosis del linfocito T, mediante la nitrosilación de residuos de tirosina, bloqueando la expresión de la proteína asociada a la prevención de la apoptosis BCL2 (del inglés, *B-cell lymphoma 2*) y, además, activando la expresión de la proteína CD95L o de TIM-3 (del inglés, *T Cell Immunoglobulin Mucin-3*) en el linfocito T, que favorece la apoptosis de éste cuando entra en contacto con la MDSC (Hildeman et al., 2003a; Hildeman et al., 2003b; Dardalhon et al., 2010).

Recientemente, se ha descrito que las MDSCs pueden promover *de novo* el desarrollo de las células Treg que expresan FoxP3 (Huang et al., 2006; Yang et al., 2006b). Para su inducción, las MDSCs requieren de la activación de los linfocitos T en el tumor y requieren de la presencia de IFN γ e IL-10, siendo dependiente únicamente de la expresión de Arg-1 y no de la expresión de iNOS. Además, se requiere la expresión en las MDSCs del antígeno linfocitario citotóxico (CTLA-4, del inglés *Cytotoxic Lymphocyte Antigen-4*), también conocido como CD152 (Huang et al., 2006; Yang et al., 2006b).

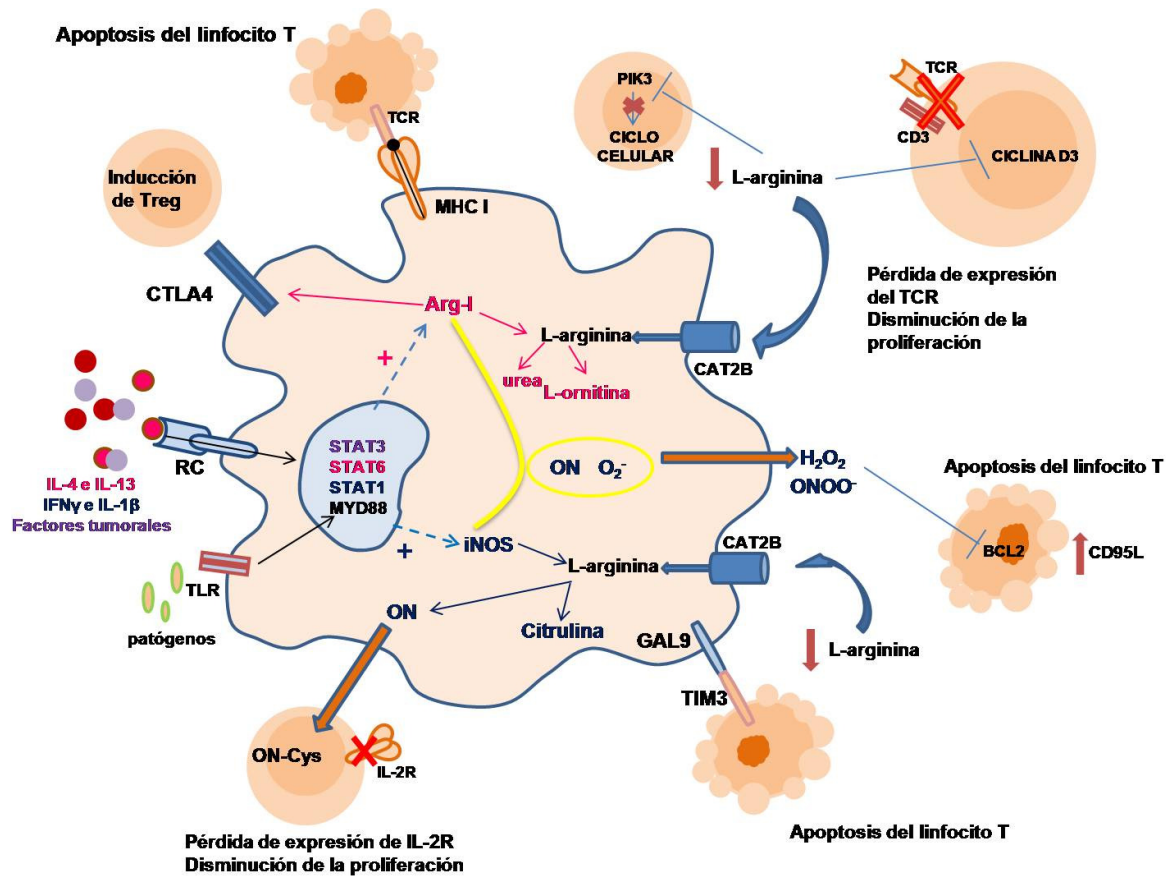


Figura 3: Mecanismos inmunosupresores de las Células Supresoras Derivadas de Mieloides sobre los linfocitos T. Los diferentes factores de estimulación (IL-4, IL-13, IFN γ , IL-1 β , factores tumorales) activan a las señales de activación de la transcripción y traducción (STAT, del inglés *Signal Transducer and Activator of Transcription*) y promueven en las MDSCs la expresión de las enzimas Arg-I e/o iNOS y de CAT. La L-Arginina disminuye en el medio extracelular y produce la reducción de la proliferación del linfocito T por la disminución de la expresión de IL-2R o la anergia del TCR (mediante el bloqueo de PIK3 o de la Ciclina D3). La Urea, L-Ornitina, L-Citrulina y el ON producidos debido a la expresión de Arg-I e iNOS, respectivamente, junto a los peroxinitros y ROS, inducen la expresión de CD95L o TIM3 en el linfocito T que favorece su apoptosis mediante contacto celular directo. Además, la expresión de la molécula MHC (del inglés *Major Histocompatibility Complex*) en la MDSCs induce la apoptosis del linfocito T de manera antígeno-específica. TLR (del inglés *Toll like Receptor*). Modificado de: Gabrilovich et al., 2012.

Implicación de las Células Supresoras Derivadas de Mieloides en cáncer y en trasplantes

El cáncer es la patología donde las MDSCs han sido más estudiadas. Tanto en pacientes con cáncer como en modelos animales de esta enfermedad hay un elevado número de MDSCs en la sangre, la médula ósea, en el bazo y en el propio tumor, generando la inmunosupresión del linfocito T y, además, induciendo la angiogénesis, la

invasión celular y procesos de metástasis en el tumor (Gabrilovich et al., 2001; Kusmartsev et al., 2003; Bronte et al., 2003a; Bunt et al., 2007; Serafini et al., 2008; Schmid y Varner, 2012). Todas estas propiedades han hecho que las MDSCs sean un punto clave de estudio en esta patología para encontrar nuevas terapias que las eliminen y restauren la respuesta inmune por parte de los linfocitos T en el tumor.

Por otro lado las MDSCs también han sido estudiadas en otras condiciones patológicas, como en pacientes con infecciones e inmunodeprimidos, que han sido sometidos a una cirugía mayor o presentan un traumatismo grave. En estos pacientes la presencia de MDSCs induce la apoptosis del linfocito T, disminuyendo así, la respuesta inmune frente al agente infeccioso (Hotchkiss et al., 2001; Goñi et al., 2002; Delano et al., 2007), lo que contribuye a la expansión de la infección, a que fracase la erradicación de esta y a la predisposición a sufrir infecciones nosocomiales secundarias (Ichihara et al., 1999; De et al., 2000; Ochoa et al., 2001a; Ochoa et al., 2001b; Riedemann et al., 2003; Hotchkiss et al., 2003; Makarenkova et al., 2006; Cuenca et al., 2011).

Recientemente, las MDSCs han cobrado un papel importante en los fenómenos asociados a la tolerancia al trasplante (Boros et al., 2010). En 2008, Dugast y cols. demuestran que el tratamiento con anti-CD28 a ratas con trasplante renal aumenta la supervivencia a largo plazo en estos animales debido al incremento de la densidad de MDSCs en sangre periférica, que induce un estado de tolerancia al trasplante al controlar la proliferación de los linfocitos T (Dugast et al., 2008). Además, la administración de IL-33 a ratones con alotrasplante (el donante y el receptor son genéticamente distintos y de la misma especie) de corazón incrementa la presencia de MDSCs en el bazo y se correlaciona con la prolongación de la supervivencia del injerto (Turnquist et al., 2011). Por otro lado, los ratones con aloinjerto de piel tratados con el GM-CSF e IL-2 presentan un incremento del número de MDSCs y de células Treg en la circulación sanguínea que favorece la tolerancia al aloinjerto en dichos ratones (Adeegbe et al., 2011). Todos estos datos aportan una nueva visión de las MDSCs como nuevo agente terapéutico pudiendo aportar efectos beneficiosos

cuando la respuesta inmunosupresora sea necesaria, como ocurre en los trasplantes o en las enfermedades autoinmunes (como la esclerosis múltiple).

Células supresoras derivadas de mieloides en EAE

El análisis de la expresión génica de la médula espinal de ratones con EAE en el pico de la escala clínica y en el momento de su recuperación muestra que, de los 22.000 genes examinados, el gen *arg-1* tiene una mayor tasa de expresión con respecto a los ratones control (Carmody et al., 2002). Además, un estudio posterior muestra que la médula espinal de los ratones con EAE presenta una gran actividad de la enzima Arg-1 y que dicha actividad está asociada al periodo de máxima escala clínica (Xu et al., 2003).

Por otro lado, el análisis del bazo de los ratones con EAE de la cepa BALB/c muestra la presencia de un alto porcentaje de células CD11b con capacidad de suprimir la proliferación del linfocito T CD4 *in vitro*. El marcaje de estas células con Gr-1, diferenciando entre sus epítomos Ly-6C y Ly-6G, indica que en el bazo de los ratones EAE hay 3 poblaciones celulares diferentes: las células CD11b⁺/Ly-6C^{low}/Ly-6G⁻ (clasificadas como una población mixta de monocitos y eosinófilos), las células CD11b⁺/Ly-6C^{int}/Ly-6G⁺ (clasificadas como neutrófilos) y por último las células CD11b⁺/Ly-6C^{high}/Ly-6G^{-/low} (clasificadas como monocitos). El estudio *in vitro* de estas tres poblaciones celulares muestra que sólo la última población, mediante la actividad de Arg-1 e iNOS, tiene la capacidad de disminuir la proliferación del linfocito T CD4 y CD8 y de promover su apoptosis cuando estos son previamente estimulados con anti-CD3 y anti-CD28 (Zhu et al., 2007). Así mismo, diversos ensayos *in vitro* muestran que las MDSCs únicamente llegan a ejercer la inmunosupresión del linfocito T mediante contacto celular directo (Apolloni et al., 2000; Zhu et al., 2007; Slaney et al., 2011).

Durante el curso de la EAE hay un incremento en el porcentaje de las MDSCs en el SNC de los ratones inmunizados y dichas células tienen la capacidad de polarizarse a DCs, actuando, además, como APCs debido al aumento de la expresión de los marcadores de superficie CD11c y MHCII (King et al., 2009). Además, las MDSCs extraídas de la sangre de

los ratones con EAE antes del desarrollo de los primeros síntomas clínicos de la enfermedad (a 5 dpi) no inducen la inmunosupresión del linfocito T activado cuando ambas poblaciones celulares están en co-cultivo (Slaney et al., 2011); sin embargo, cuando se activan las MDSCs con IFN γ , GM-CSF y LPS (Lipopolisacárido), y se transfieren a ratones con EAE, éstos desarrollan un curso clínico menos severo que los ratones con EAE tratados con el vehículo (King et al., 2009; Zhu et al., 2011). Todo ello se debe a que las MDSCs desarrollan diferentes funciones, dependiendo del momento clínico de la enfermedad: mientras las MDSCs extraídas del SNC en el inicio de los síntomas clínicos de la EAE funcionan principalmente como APCs, las MDSCs extraídas en el pico máximo de los síntomas clínicos tienen propiedades inmunosupresoras (Zhu et al., 2011).

Hay pocos trabajos que muestren la participación en la EAE de la población de MDSCs con fenotipo granulocítico. Mientras que los neutrófilos extraídos del SNC de los ratones de la cepa SJL/J con EAE tienen la capacidad de inmunosuprimir a los linfocitos T (Zehntner et al., 2005), en los ratones de la cepa C57BL/6 con EAE el incremento del porcentaje de neutrófilos en su SNC desde los primeros síntomas clínicos hasta el pico de máxima discapacidad se correlaciona con la intensa degeneración axonal que aparece en dicho periodo (Wu et al., 2010; Ioannou et al., 2012).

Por otro lado, se ha observado que los pacientes con EM-RR durante el periodo de máxima actividad de la enfermedad presentan una mayor expresión en la sangre de marcadores típicos de neutrófilos (CD10, CD13, CD11b, CD18) y de TNF α , citoquina necesaria para la activación de este tipo celular, en comparación a los pacientes con EM-RR que están en el periodo de remisión de la enfermedad o en comparación con los pacientes con EM-SP (Ziaber et al., 1998). Un estudio más reciente corrobora que los pacientes con EM-RR en el periodo de máxima actividad presentan un incremento en el porcentaje de neutrófilos, principalmente en estado activado y que dichas células debido a su actividad citotóxica pueden estar contribuyendo a la patogenia de la EM, mediante el incremento de la respuesta pro-inflamatoria y el daño tisular (Naegele et al., 2012).

Tratamientos moduladores de las Células Supresoras Derivadas de Mieloides

El papel deletéreo de las MDSCs en el cáncer ha favorecido el desarrollo de diferentes terapias farmacológicas encaminadas principalmente hacia la eliminación de estas células o a impedir que lleven a cabo sus funciones inmunosupresoras (Ugel et al., 2009). Se distinguen cuatro clases diferentes de terapias farmacológicas: a) que potencian la diferenciación de las MDSCs; b) que potencian la maduración de su precursor hematopoyético; c) que impiden la acumulación de las MDSCs en órganos linfoides; d) que inhiben alguno de los mecanismos de supresión de las MDSCs (Tabla 2; Ugel et al., 2009).

Tabla 2: Tratamientos moduladores para las MDSCs. Modificada de: Ugel et al., 2009.

DIFERENCIACIÓN DE LAS MDSCs	
ATRA (Ácido Trans-retinoico)	Favorece la diferenciación a granulocitos, macrófagos y células dendríticas
Vitamina D3	Reduce el número de células CD34, incrementa la expresión de HLA-DR, IL-12, IFN γ y la blastogénesis del linfocito T.
MADURACIÓN DEL PRECURSOR HEMATOPOYÉTICO	
Inhibidores de STAT3	Favorecen la maduración del precursor hematopoyético, ya que inhiben genes antiapoptóticos, proliferativos, proangiogénicos y la producción de ROS
ACUMULACIÓN DE LAS MDSCs	
Gemcitabina, 5-Fluoracil y antagonistas de los receptores quimioquinas 2 y 4 (CXCR2 y CXCR4)	Reducen el número de células CD11b ⁺ /Gr-1 ⁺
MECANISMOS DE SUPRESIÓN DE LAS MDSCs	
Inhibidores de Arg-I y NOS	Reducen la activación de Arg-I y NOS Reducen la expresión del receptor de IL-4

CXCR (Receptor de la quimioquina CXC).

5. Ácido retinoico

El ácido retinoico es un derivado de la vitamina A que interviene en el control de la diferenciación, proliferación y apoptosis celular, siendo esencial para el desarrollo y embriogénesis normal en mamíferos (Evans y Kaye, 1999; Walkley et al., 2002). El ácido retinoico está presente en el plasma humano a una concentración de 10-20 nM y puede encontrarse en dos formas estereoisoméricas: aproximadamente en un 75% está como ácido retinoico todo-trans (ATRA) y en un 25% como ácido retinoico 13-Cis (Napoli, 1986; Dawson et al., 2008). El ácido retinoico regula la transcripción de la expresión de más de 300 genes diferentes mediante la unión a receptores nucleares específicos para el ácido retinoico. Estos receptores se pueden clasificar en dos subfamilias: los receptores del ácido retinoico (RAR) y los receptores X de retinoides (RXR). En ambos casos, cada receptor está codificado por tres genes, α , β y γ , que generan varias isoformas de cada uno (Mark et al., 2006). Estos receptores forman heterodímeros (RAR/RXR) que reconocen elementos de respuesta al ácido retinoico (RARE, del inglés *Retinoic Acid Response Elements*) y que tienen efectos diferenciadores sobre los linfocitos Th1 y Th17 (Napoli, 1986; Chen et al., 1994; Walkley et al., 2002).

Uso terapéutico del ATRA

El ATRA, mediante su unión a RAR, tiene un papel importante en la modulación de la activación y en la producción de citoquinas por parte de los linfocitos Th1, Th2 y Th17, así como de las células Treg, lo cual favorece la producción de citoquinas anti-inflamatorias (Napoli, 1986; Walkley et al., 2002; Dawson et al., 2008; Nishimori et al., 2012). Además, la administración de ATRA induce la apoptosis en la línea celular de linfocitos T Jurkat (Engedal et al., 2009).

Pero es la capacidad diferenciadora de las MDSCs lo que ha hecho del ATRA un agente terapéutico aprobado para el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda. Se trata de un subtipo de la leucemia mieloide aguda que se caracteriza por la acumulación de

promielocitos en médula ósea y sangre periférica, reemplazando a los glóbulos blancos normales (Sanz, 2006; Tallman y Altman, 2009). Normalmente, el tratamiento que se utiliza en este tipo de leucemia es la quimioterapia combinada con la administración de ATRA, debido a sus propiedades en la diferenciación de las células mieloides inmaduras a granulocitos (Walkley et al., 2002). Gracias a esta terapia combinada, aproximadamente del 80 al 90% de los pacientes presentan una remisión total de la enfermedad (Tallman y Altman, 2009).

Diversos estudios muestran la influencia que ejerce el ácido retinoico sobre la población de células mieloides. Así, los ratones *knock-out* para RAR (α y γ) no tienen la capacidad de desarrollar granulocitos (Labrecque et al., 1998). Los ratones deficientes para la vitamina A tienen una expansión anormal del número de células mieloides, que se invierte con el tratamiento con ATRA (Kuwata et al., 2000). Por otro lado, el tratamiento con ATRA a ratones con adenocarcinoma y a pacientes con cáncer renal es efectivo para la resolución de la enfermedad, no por un efecto directo del tratamiento sobre las células cancerígenas o la disminución de factores de crecimiento en el tumor, sino porque el fármaco induce la maduración de las IMCs hacia un fenotipo más maduro (Kusmartsev et al., 2003; Mirza et al., 2006). Este cambio de fenotipo genera una disminución en el número de MDSCs en el tumor que conlleva la restauración de la respuesta inmune mediada por los linfocitos T (Kusmartsev et al., 2003). Estudios *in vitro* e *in vivo* más recientes, en pacientes con carcinoma renal y en ratones a los que se indujo un cáncer, muestran que el tratamiento con ATRA induce la diferenciación de las MDSCs, bloqueando la producción de ROS, mediante un incremento de la regulación de la enzima glutatión sintasa y la acumulación de glutatión (Nefedova et al., 2007).

Todos estos datos apuntan hacia la importancia del ácido retinoico en la diferenciación de las IMCs, en general, y el desarrollo de granulocitos, en particular, pues los retinoides controlan la homeostasis de la población de las células mieloides *in vivo* y su carencia puede contribuir a diversos trastornos mieloproliferativos (Kuwata et al., 2000).

Ácido retinoico sintético (Am80)

A pesar de los beneficios del ATRA en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda, este compuesto presenta también algunos problemas. La unión del ATRA con proteínas celulares de unión al Ácido Retinoico (CRABP, del inglés *Cellular Retinoic Acid Binding Protein*) provoca la disminución del fármaco en el plasma de los pacientes tratados y da pie a un proceso de tolerancia al tratamiento (Cornic et al., 1994a; Cornic et al., 1994b; Zhou et al., 1998). Por otro lado, la unión inespecífica del ATRA a varios receptores RAR genera numerosos efectos secundarios, como la aparición de rash cutáneo y el síndrome de ácido transretinoico (Ohnishi, 2007; Sastre et al., 2007; Tallman y Altman, 2009). Para evitar ambos se generó el ácido retinoico sintético, conocido como tamibaroteno o Am80 (Tobita et al., 1997; Ohnishi, 2007; Miwako y Kagechika, 2007). El Am80 fue desarrollado en Japón (Kagechika et al., 1988) y en 2005 fue aprobado en este mismo país como tratamiento contra la leucemia promielocítica aguda. Su unión altamente específica a RAR α reduce enormemente la posibilidad de aparición de efectos secundarios. Por otro lado, el Am80 tiene baja afinidad de unión a las CRABP, por lo que también disminuyen los fenómenos de tolerancia (Klemann et al., 2009; Ugel et al., 2009). Además, el tratamiento de la línea celular mieloide HL-60 con Am80 *in vitro* muestra un incremento del porcentaje de células mieloides que entran en apoptosis (Jimi et al., 2007).

Am80 como terapia anti-inflamatoria en EAE

En EAE, el Am80 se ha utilizado principalmente por sus propiedades anti-inflamatorias, ya que inhibe la diferenciación y la función efectora de los linfocitos Th17, lo que lleva a una reducción de los síntomas clínicos de la enfermedad (Klemann et al., 2009). Sin embargo, el momento de administración del tratamiento presenta respuestas diferentes en la modulación de la respuesta autoinmune. Cuando Am80 es administrado antes de la aparición de los síntomas clínicos, los ratones con EAE presentan en el pico máximo de discapacidad de la enfermedad una reducida expresión de genes específicos para Th17,

como el receptor nuclear huérfano asociado al ácido retinoico (ROR), la IL-17 y el receptor de la IL-23 (IL-23R), mientras que no se ve alterada la expresión de los marcadores de activación de los linfocitos T (CD62L, CD44 y CD25), ni se observan variaciones en la expresión de FoxP3, o en el número de células que lo expresan. Todo ello conlleva un curso clínico menos severo (Klemann et al., 2009). Por el contrario, cuando Am80 se administra en un estadio más avanzado de la EAE, cerca del pico máximo de discapacidad, y se mantiene el tratamiento a largo plazo, los ratones con EAE presentan en su SNC una marcada disminución del ARNm de IL17 e IL-23R y los linfocitos T producen bajos niveles de citoquinas pro-inflamatorias, aunque también disminuye la expresión de Foxp3 y de IL-10. Esto produce en los ratones con EAE un curso clínico crónico desde el inicio del tratamiento que indica que la disminución de la respuesta Th17 pro-inflamatoria es insuficiente para resolver una inflamación crónica (Klemann et al., 2009). Por tanto es esencial estudiar si la ineficacia del tratamiento con Am80 en un periodo avanzado del curso clínico de la EAE es debido a que el fármaco está alterando a la población de células mieloides.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las MDSCs son unas células de fenotipo mieloide inmaduro heterogéneo que poseen propiedades inmunomoduladoras sobre la respuesta inmune. Hasta ahora, estas células han sido ampliamente estudiadas en patologías como el cáncer e infecciones parasitarias. En el cáncer, las MDSCs son responsables del crecimiento y expansión del tumor como consecuencia de la inmunosupresión que ejercen sobre los linfocitos T. La modulación de las MDSCs mediante la administración de fármacos para reducir su acumulación, acelerar su maduración y eliminar su capacidad inmunosupresora favorece el control de la expansión del tumor (Ugel et al., 2009). En cambio, recientemente, las MDSCs han sido descritas como un mecanismo natural beneficioso del organismo para superar el rechazo a un trasplante de órganos y controlar la respuesta pro-inflamatoria en enfermedades autoinmunes (Dugast et al., 2008; Adeegbe et al., 2011). Esto sugiere que podría tratarse de un tipo celular con potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades con componente autoinmune, como la EM.

El 85% de los pacientes con EM presentan la variante recurrente-remitente (EM-RR), que se caracteriza por presentar periodos de aumento de los síntomas clínicos (brotes), seguidos de periodos de remisión total o parcial de los síntomas. La rapidez con la que se produce la inmunomodulación hacia el periodo de remisión es clave para la recuperación del paciente (Inglese, 2006). Esto hace que sea de gran importancia el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares endógenos que intervienen en dicho proceso. Por ello, el estudio de las MDSCs, como agentes inmunomoduladores en la EM, es esencial para determinar la influencia que tienen estas células en la respuesta inmunosupresora durante el curso temporal de la enfermedad. Así mismo, es fundamental conocer la distribución espacio-temporal de estas células en el SNC y qué efectos puede ejercer su modulación en el curso clínico de la EM, ya que estas células podrían ser de gran ayuda para favorecer y/o acelerar la transición de la fase recurrente a la fase remitente de la EM, favoreciendo así la recuperación sintomatológica del paciente característica de esta última fase.

OBJETIVOS

Para el abordaje de la hipótesis de trabajo nos planteamos los siguientes objetivos, divididos en dos fases de estudio:

Primera fase: Presencia de las MDSCs en el SNC durante el curso clínico de la EAE.

1. Descripción de la distribución espacio-temporal *in vivo* de las MDSCs en la médula espinal de los ratones con EAE y *sham*.
2. Estudio fenotípico *in vivo* de las MDSCs presentes en la médula espinal de ratones con EAE y *sham*.
3. Análisis de la relación entre la presencia de MDSCs presentes en la médula espinal de los ratones con EAE en el momento final del periodo de incremento de los síntomas clínicos y la proliferación y/o apoptosis de los linfocitos T infiltrados.
4. Determinación funcional *in vitro* de la capacidad inmunosupresora de las MDSCs aisladas de la médula espinal de los ratones con EAE.

Segunda fase: Modulación de la población de las MDSCs con el retinoide sintético Am80.

1. Descripción de los efectos que produce el tratamiento con Am80 en el curso clínico de la EAE.
2. Estudio *in vivo* de la variación en la distribución y el fenotipo de las MDSCs en la médula espinal de los ratones con EAE tratados con Am80.
3. Análisis *in vivo* del efecto de Am80 en la proliferación y apoptosis de los linfocitos T y las MDSCs infiltradas en la médula espinal de los ratones con EAE.
4. Análisis por citometría de flujo de la población de MDSCs y de linfocitos T en el bazo de los ratones con EAE y *sham*.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Inducción de la EAE

La inducción de la EAE ha sido realizada en ratones hembra de la cepa C57BL/6J, de 6 a 8 semanas de edad, procedentes de la casa comercial Harlan (Holanda). Todos los animales fueron manipulados de acuerdo con la regulación española (RD223/88) y europea (2010/63/UE) de manejo de animales experimentales, además de bajo las directrices aprobadas por el Comité para el Bienestar Animal del Hospital Nacional de Parapléjicos (SAPA001).

Número de animales y periodos experimentales estudiados

Fase 1 de estudio:

Para el estudio de la presencia de las MDSCs y de su caracterización fenotípica se utilizaron 24 ratones: 16 ratones inmunizados con la emulsión de MOG y CFA (EAE), 8 ratones a los que se les administró CFA y tampón bifosfato salino a 1X, pH 7,4 (PBS) en lugar de MOG (*sham*) y 2 ratones a los que no se administró nada (ratones control). A lo largo del curso temporal de la EAE, se emplearon 4 ratones EAE y 2 ratones *sham* en cada uno de los 4 estadios analizados: 15 dpi, que se corresponde al final del periodo de incremento de los síntomas clínicos, 25 dpi, como final del periodo de remisión parcial de los síntomas clínicos, y 35 y 63 dpi, que se corresponden con un periodo inicial y tardío respectivamente, de la fase crónica. Estos cuatro periodos experimentales determinaron el momento de sacrificio de los animales para la obtención de muestras de tejido.

Fase 2 de estudio:

Para estudiar los efectos de la modulación de la población de MDSCs mediante la administración de Am80, se clasificaron en dos grupos experimentales:

Grupo Am80: Compuesto por 12 ratones a los que se les administró Am80 disuelto en el vehículo (carboximetilcelulosa, CMC). A su vez, este grupo se dividió en dos subgrupos de 6 ratones cada uno: animales inmunizados con MOG y tratados con Am80 (EAE-Am80) y animales *sham* tratados con Am80 (*sham-Am80*).

Grupo CMC: Compuesto por 12 ratones a los que únicamente se les administró el vehículo, CMC. Este grupo se dividió en dos subgrupos de 6 ratones cada uno: ratones inmunizados con MOG (EAE-CMC) y ratones *sham* (*sham*-CMC).

Previamente a la inducción de la EAE, los animales fueron aclimatados durante una semana en las condiciones ambientales adecuadas (Tabla 3), y su alimentación, durante todo el periodo de estabulación, fue *ad libitum*.

Tabla 3: Características ambientales para los ratones

Temperatura (°C)	20-24
Humedad relativa (%)	50-60
Ventilación (cambios/hora)	15
Ciclos de luz/oscuridad (horas)	12-14

Procedimiento de la inmunización

Transcurrido el periodo de aclimatación, los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal con 40 μ l por ratón de una mezcla de anestésico que contenía 37 mg/kg de Ketolar® y 5,5 mg/kg de Xilagesic®. Para ello se inmovilizó al animal y se le inyectó la mezcla de anestésico en el cuadrante inferior derecho, lateral a la línea media (1 cm aprox.) para evitar la inyección en la vejiga urinaria, y al menos 2 cm caudal a la última costilla para evitar inyectar en el hígado (lado derecho) o en el estómago (lado izquierdo). La cabeza se situó en un plano inferior al resto del cuerpo, inclinando al animal, para así reducir los riesgos de inyección dentro de un órgano abdominal. Una vez dormidos, los ratones fueron marcados en las orejas y pesados. Para evitar su hipotermia durante el proceso de inmunización, los ratones se manipularon sobre una manta térmica.

A continuación, se procedió a la preparación de la emulsión de inmunización, que contenía la proteína MOG (amablemente suministrada por el Dr. A. Silva, del Centro de

Investigaciones Biológicas-CSIC, Madrid) preparada a una concentración de 2 mg/ml (200 μ g/ratón en un volumen de 100 μ l de PBS estéril) y el CFA que contenía, adyuvante incompleto de Freund (Sigma) y partículas inactivadas de *M. Tuberculosis* (H37RA, Gifco) a una concentración de 4 mg/ml.

Para la emulsión de la proteína MOG y el CFA se utilizó una llave de 3 vías (Sendal) a la que se adaptó dos jeringuillas (Shalix) de 2 ml, cada una con el mismo volumen de ambos componentes. La preparación se llevó a cabo mediante el paso del MOG y el CFA de una jeringuilla a la otra a través de la llave de 3 vías (Fig. 4).

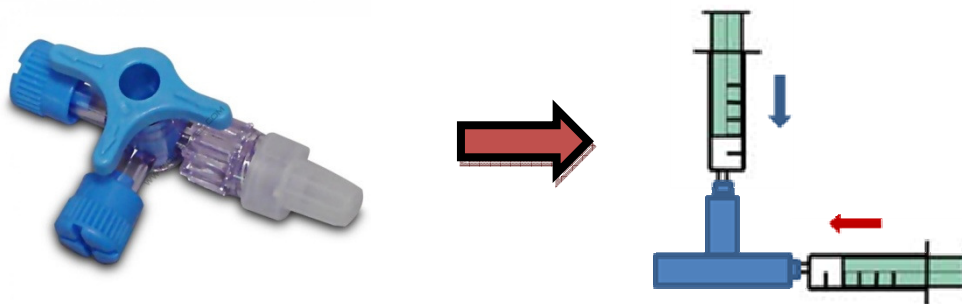


Figura 4: Esquema del procedimiento de la emulsión de inmunización. La jeringuilla con MOG y la jeringuilla con CFA se adaptan a una llave de tres vías. Para realizar la emulsión ambos componentes se pasan a través de la llave, haciendo pasar primero un componente de una jeringuilla a la otra jeringuilla y así sucesivamente hasta formar una solución homogénea.

Una vez emulsionados el MOG y el CFA se retiró una de las jeringuillas de 2 ml y se adaptó una jeringuilla de insulina (Shalix), con la que se administró por vía subdérmica 200 μ l de la emulsión a cada ratón repartida a partes iguales (50 μ l) entre las ingles y las axilas. Para ello, se realizó un pliegue de piel en cada una de estas áreas con los dedos índice y pulgar. A continuación, se introdujo la aguja debajo del pliegue y paralela a la superficie corporal. La inyección de líquido se detectaba con los dedos a través de la piel, o simplemente observando la existencia de un pequeño abultamiento de la zona. Para los ratones *sham*, la emulsión fue preparada con PBS estéril y CFA.

Después de la administración de la emulsión, se inyectó por vía intravenosa en la vena de la cola, tanto a los ratones EAE como a los *sham*, un volumen de 100 μ l de toxina

perúsica (Sigma) a una concentración de 3 ng/μl por ratón. Para ello, los ratones fueron introducidos en un cepo de inmovilización (Cibertec) donde la cola quedó fuera para su manipulación. La dilatación de la vena se realizó mediante la aplicación de calor con las manos. Este último paso se repitió 48 horas después de la inmunización.

El día de la inmunización marcó la cronología de nuestro estudio, que medimos en días post-inmunización (dpi). Desde el primer dpi, los síntomas clínicos fueron evaluados diariamente por dos evaluadores con la siguiente escala clínica: 0= sin síntomas detectables; 0,5= pérdida de tono en la parte final de la cola; 1= pérdida total de tono en toda la cola; 1,5= ligera pérdida de fuerza en las patas traseras; 2= pérdida total de fuerza en las patas traseras; 2,5= parálisis total unilateral de la extremidad trasera; 3= paraplejia y debilidad en las patas delanteras; 3,5= paraplejia y pérdida unilateral de movimiento en la extremidad delantera; 4= tetraplejia; 4,5= moribundo y 5= muerto.

2. Tratamiento de Am80 mediante sonda oral

La administración forzada u *oral gavage* de un fármaco por vía enteral se realiza a través de un catéter introducido por la boca hasta el esófago o el estómago. Este tratamiento se utiliza cuando es necesario administrar un volumen y una concentración específica de un fármaco de manera oral. En roedores, se utiliza normalmente un catéter metálico recto o curvo con el extremo abotonado (redondeado y ligeramente abultado) para evitar dañar el tracto digestivo a su paso, o mediante una sonda plástica procedente de una vía intravenosa (Fig. 7A-B).

Para la administración de Am80 (Sigma), éste se diluyó a una concentración de 3 mg/kg por cada ratón en 0,5% de CMC (Dako) en agua destilada. El volumen máximo que se debe suministrar con este método es de 10 ml/kg. Tratándose de ratones hembra de aproximadamente 20 gr de peso, el volumen administrado fue de 200 μl.

El inicio del tratamiento, tanto para los ratones EAE como para los *sham*, comenzó a 17 dpi, 4 días después del inicio de los síntomas en los animales inmunizados, momento en el que todos los ratones alcanzaron una escala clínica mínima de 2. La duración del tratamiento fue de 5 días, durante los cuales los ratones fueron tratados diariamente con el fármaco (Am80) o su vehículo (CMC) y, finalmente, fueron sacrificados un día después de la última dosis (22 dpi). Para la administración del fármaco o el vehículo, se introdujo una cánula procedente de una vía intravenosa (BD) de 0,8 x 25 mm de tamaño (Fig. 5A, enmarcado en azul). Para ello, cada ratón fue inmovilizado de forma que la cabeza, el cuello y el tórax formaran una línea recta (Fig. 5B). A continuación, se introdujo el catéter por la boca del animal, avanzando por la faringe hasta el estómago, inyectándose la solución correspondiente.

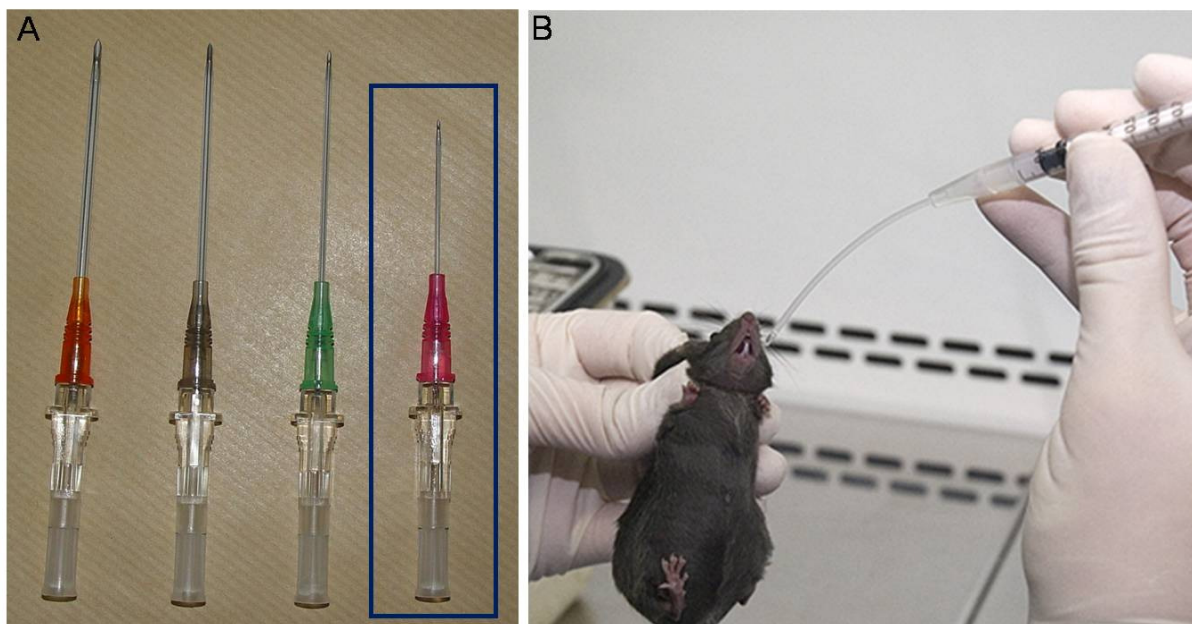


Figura 5: Vías intravenosas y manipulación del animal: El tamaño de vía intravenosa que se debe usar depende del tamaño del animal. En nuestro caso, utilizamos una vía intravenosa de tamaño pequeño (enmarcado en **A**). Para su manipulación, el animal debe ser mantenido con la cabeza en línea recta con el resto del cuerpo, para no dañar ningún órgano con el paso de la sonda (**B**). Modificado de: www.procedureswithcare.org.uk/alt/2010/oral-gavage-in-the-mouse/.

3. Procesado del tejido para histología

Fijación del tejido mediante perfusión intracardiaca

El procesado del tejido se llevó a cabo en los diferentes tiempos experimentales mencionados anteriormente mediante la perfusión intracardiaca con paraformaldehído (PFA, Sigma) al 4% en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 (PB). Una vez dormido el ratón tras inyectarle una dosis de 100-200 μ l de Dolethal®, se practicó una laparotomía junto a una toracotomía que permitió el acceso al corazón. Posteriormente, con unas tijeras de microdissección, se realizó una incisión en la aurícula derecha para permitir la salida de sangre y del líquido fijador. A continuación, el ventrículo izquierdo se cateterizó con una cánula hasta el comienzo de la aorta, que estaba conectada a una bomba peristáltica que hacía pasar, primero, PBS durante 3 minutos para permitir el lavado del árbol arterial y, posteriormente, el líquido fijador durante 5 minutos (Fig. 6). El flujo de líquido administrado fue de 18 ml/min, tanto para el PBS como para el PFA.

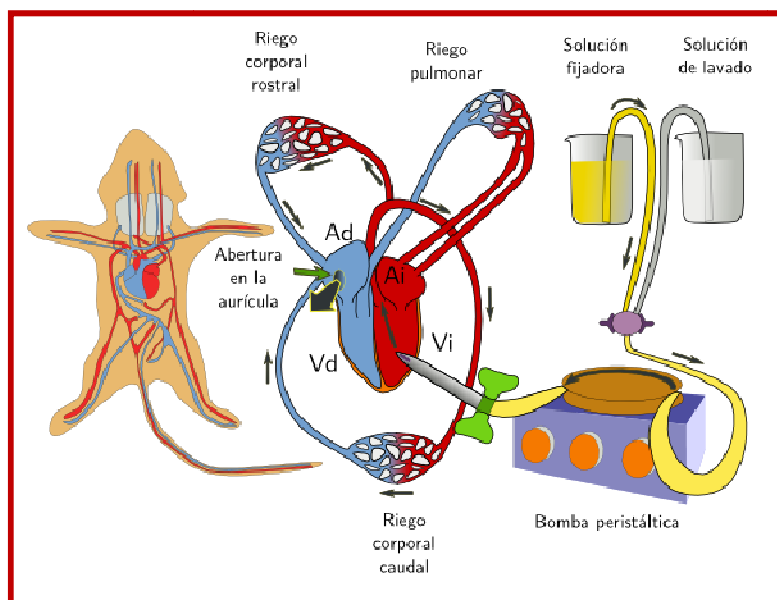


Figura 6: Esquema para una perfusión intracardiaca. Ad: Aurícula derecha; Ai: Aurícula izquierda; Vd: Ventrículo derecho; Vi: Ventrículo izquierdo. Tomado de: <http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/2-metodos-fijacion.php>

Postfijación del tejido mediante inmersión

Una vez extraída la médula espinal de los ratones perfundidos, se sumergieron en el mismo fijador empleado en la perfusión (PFA al 4%) durante 4 horas, en agitación y a temperatura ambiente (TA).

Crioprotección y congelación del tejido

Finalizado el proceso de postfijación, las médulas espinales de los ratones EAE y *sham*, pertenecientes a los diferentes estadios experimentales estudiados, fueron lavadas con PB durante 12 horas, en agitación y a 4°C, para eliminar el exceso de fijador. Posteriormente, las muestras se crioprotegieron mediante su inmersión en soluciones de concentración creciente de sacarosa (Sigma) al 10, 20 y 30% en PB, a 4°C, durante 1 hora, 1 hora y 12 horas, respectivamente. Un vez que las médulas espinales se hundieron en la mezcla crioprotectora, se dividieron en tres partes: cervical, torácica y lumbar. Posteriormente, cada sección se congeló en hielo seco mediante la inclusión de la muestra en OCT (Tissue-tek, Leica) y se conservaron a -80°C hasta su uso. La zona torácica de cada médula espinal fue cortada coronalmente en un criostato (Leica), obteniéndose secciones de manera seriada de 20 µm de grosor que fueron recogidas en portaobjetos Superfrost® Plus. Finalmente, se conservaron a -20°C hasta su utilización.

4. Tinción para mielina

Las secciones se secaron durante 2 horas a TA y durante 2 horas más a 37°C. A continuación, se sumergieron en acetona fría durante 5 minutos a TA, dejando que se evaporara durante 30 minutos los restos de la misma. Posteriormente, las secciones se tiñeron con una solución que contenía 0,2 % de Eriocromo Cianina (EC; Sigma), 0,5 % de ácido sulfúrico (H₂SO₄, Sigma) y un 4% de aluminio férrico (Sigma, preparado al 10% en agua destilada) en agua destilada, durante 30 minutos, a TA. Las secciones se lavaron en agua corriente para la eliminación del exceso de colorante y se diferenciaron mediante su inmersión en una solución acuosa de 5 % de aluminio férrico (Sigma) al en agua destilada

durante 10 minutos, a TA. Se realizó un segundo lavado con agua corriente y posteriormente las secciones se sumergieron en bórax-ferrocianuro, durante otros 10 minutos. Tras lavar con agua corriente, y una vez comprobado al microscopio la correcta diferenciación de la tinción, las secciones se deshidrataron en una batería de etanol (Panreac) al 70, 80, 90, 95 y 100%, se aclararon en dos baños de xileno (Panreac) al 100% y se montaron con cubreobjetos, usando como medio de montaje Entellan (Merck).

5. Inmunohistoquímica con DAB

Una vez descongeladas las secciones durante 1 hora a TA, se lavaron 4 veces durante 15 minutos con PB, en agitación y a TA. A continuación, se inactivaron las peroxidasas endógenas del tejido durante 20 minutos mediante el pre-tratado con H₂O₂ al 3% y metanol (Panreac) al 10% en PB, en agitación y a TA. Las secciones se lavaron 2 veces durante 10 minutos en PB y una tercera en PBS, en agitación y a TA. El tejido se preincubó durante 1 hora con medio de preincubación, que contenía un 5% de suero normal de caballo (Vector) y un 0,2 % de Triton X-100 (Sigma) en PBS, a TA, en oscuridad y en cámara húmeda. A continuación, se expusieron al anticuerpo primario contra Arg-I (Santa Cruz) a una concentración de 1:50 durante 12 horas, en medio de preincubación, a 4°C, en oscuridad y en cámara húmeda. Tras la eliminación del excedente de anticuerpo primario mediante 3 lavados de 10 minutos cada uno en PBS, en agitación y a TA, se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo secundario biotilnado correspondiente (Vector), a una concentración de 1:200 respecto al *stock*, en medio de preincubación, durante 1 hora a TA, en oscuridad y en cámara húmeda. Se eliminó el exceso del anticuerpo secundario como se indica para el anticuerpo primario. Previo al revelado en DAB, se amplificó la señal mediante el método ABC (Vector) en 0,2 % de Triton X-100 en PBS. Las concentraciones utilizadas para los componentes A y B del Kit ABC fueron de 5 µl/ml para ambos componentes. La incubación se realizó durante 1 hora a TA, en oscuridad y en cámara húmeda. El medio ABC fue preparado al menos media hora antes de su utilización, manteniéndose en oscuridad. Tras dos lavados en PBS, durante 10 minutos y un tercer lavado de 10 minutos

en Tris-HCl 0,1M, pH 7,6 (Tris), en agitación y a TA, se procedió al revelado con Diaminobencidina (DAB; Sigma) al 0,05 % y H₂O₂ al 0,003 % en Tris. La reacción se controló al microscopio y se paró con varios lavados en PB. Finalmente, las secciones se deshidrataron, aclararon y montaron de igual manera que para la EC.

6. Inmunofluorescencia

Una vez descongeladas y lavadas, las secciones se pretrataron, únicamente con metanol, y posteriormente se lavaron como indica el apartado anterior. A continuación, el tejido se preincubó durante 1 hora con medio de preincubación, que contenía un 5% de suero normal de burro (SNB; Millipore) y un 0,2% de Triton X-100 (Sigma) en PBS, en oscuridad y en cámara húmeda a TA. A continuación, se incubaron con la mezcla de anticuerpos primarios y la lectina de tomate en la solución de preincubación (Tabla 4), durante 12 horas, a 4°C, en oscuridad y en cámara húmeda. Tras eliminar el excedente se realizó el revelado mediante la utilización de anticuerpos secundarios de fluorescencia (o estreptavida para el caso de la lectina de tomate a una concentración de 1:500) a una concentración de 1:1000 en medio de preincubación. Los núcleos se contratiñeron con Hoechst (Sigma) a una concentración de 1:10, respecto al *stock* (100 µg/ml de Bis-bencimida en agua milliQ) en PBS y durante 10 minutos a TA, en oscuridad y en cámara húmeda. Finalmente, las secciones se lavaron en PBS y se montaron en cubreobjetos con medio de montaje Fluoromount (SouthernBiotech).

7. Técnica de detección de apoptosis

La apoptosis de los linfocitos T y de las MDSCs se analizó mediante la técnica de TUNEL (del inglés, *terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-fluorescein nick end-labeling*) con el *Kit ApopTag Plus Fluorescein In Situ Apoptosis* (Millipore, S7111). Para ello, las médulas espinales seccionadas y guardadas a -20°C fueron descongeladas durante 1 hora a TA. El tejido se lavó 3 veces durante 10 minutos en PB, en agitación y a TA. A continuación, se fijó con PFA al 1% en PB, durante 10 minutos, en agitación y a TA.

Tras lavar el PFA se realizó la post-fijación del tejido durante 5 minutos en una mezcla 2:1 de etanol y ácido acético absolutos, a -20°C . Se realizaron 2 lavados de 5 minutos en PBS, en agitación, a TA y se llevó a cabo la incorporación catalítica de dUTP-fluoresceína en los extremos 3'-OH del ADN siguiendo las instrucciones del fabricante del kit. Una vez marcado el ADN, se realizó una inmunohistoquímica (procedimiento descrito anteriormente) con los siguientes anticuerpos: CD4, CD8, Arg-I y Gr1 (Tabla 4). Finalmente, los núcleos se contratiñeron con Hoechst como en el resto de técnicas y las secciones se montaron con cubreobjetos utilizando medio de montaje Fluoromount (SouthernBiotech). Las células se consideraron apoptóticas cuando mostraron en mayor o menor grado condensación de la cromatina nuclear con bis-benzimida (Hoechst, Sigma), y además fueron TUNEL positivas.

Tabla 4: Anticuerpos primarios para inmunofluorescencia

Anticuerpo	Diana	Dilución	Tipo	Casa comercial
Arg-I	Arginasa-I	1:25	Policlonal anti-ratón hecho en cabra	SCBT
CD4	Linfocitos T CD4	1:25	Monoclonal anti-ratón hecho en rata	eBioscience
CD8	Linfocitos T CD8	1:25	Monoclonal anti-ratón hecho en rata	eBioscience
CD11b	Microglía/macrófagos	1:250	Monoclonal anti-ratón hecho en rata	Serotec
CD115	M-CSFR1	15 $\mu\text{g/ml}$	Policlonal anti-ratón hecho en conejo	Lifespan
Gr-1	Granulocitos	1:250	Monoclonal anti-ratón hecho en rata	BD Biosciences
Ly6B.2	Neutrófilos	1:100	Monoclonal anti-ratón hecho en rata	Serotec
iNOS	Oxido nítrico sintasa inducible	1:25	Monoclonal anti-ratón hecho en rata	BD Biosciences
Fosfohistona (PH3)	Núcleos en mitosis	1:200	Policlonal anti-ratón hecho en conejo	Abcam
Lectina de Tomate	Microglía/macrófagos	15 $\mu\text{g/ml}$	Biotinilada	Sigma

8. Procesado del bazo para citometría de flujo

Para el estudio de las poblaciones celulares del bazo y el aislamiento de linfocitos T se procedió a la extracción y procesado del bazo (Fig.7A-I). Para ello, se inyectó a los ratones 200 μ l de dolethal administrado intraperitonealmente. Una vez dormidos, se les realizó una incisión longitudinal en el abdomen para exponer la zona abdominal. A continuación, se extrajo el bazo y se recogió en medio de cultivo RPMI (Gibco) suplementado con un 10% de Suero Bovino Fetal (SBF; Biowhittaker), inactivado por calor y filtrado, y un 2% de penicilina/streptomicina (p/s, Sigma). Cada bazo extraído fue situado sobre un filtro (BD Biosciences), de tamaño de poro de 40 μ m, colocado sobre un falcón (Sarstedt) de 50 ml y se disgregó mecánicamente con el émbolo de una jeringuilla de 2 ml (BD Biosciences). A continuación, se lavó el filtro con el mismo medio para así recoger el mayor número de células posibles. La suspensión de células se centrifugó a 1500 rpm, durante 5 minutos, en una centrífuga de rotor basculante (Heraeus). Para eliminar los eritrocitos, el sobrenadante se aspiró y el pellet de células fue resuspendido en 1 ml de tampón de lisis, solución que contiene 0,15 M de ClNH_4 , 9mM de HCO_3K y 0,1 M de EDTA en agua destilada, durante 1 minuto a 4°C. Inmediatamente después, la reacción de lisis se paró añadiendo a cada muestra 50 ml de PBS estéril (Sigma) frío a 4°C. A continuación, las muestras se centrifugaron a 1500 rpm, durante 5 minutos. El sobrenadante fue eliminado mediante aspiración y se añadió a cada tubo 10 ml de PBS estéril frío. El número de células se contó en la cámara de Neubauer. Para ello, previamente hicimos una dilución 1:10 de la suspensión celular en PBS estéril y se tomaron de ésta 10 μ l, que fueron resuspendidos en otros 10 μ l de Tripán Blue (Gibco).

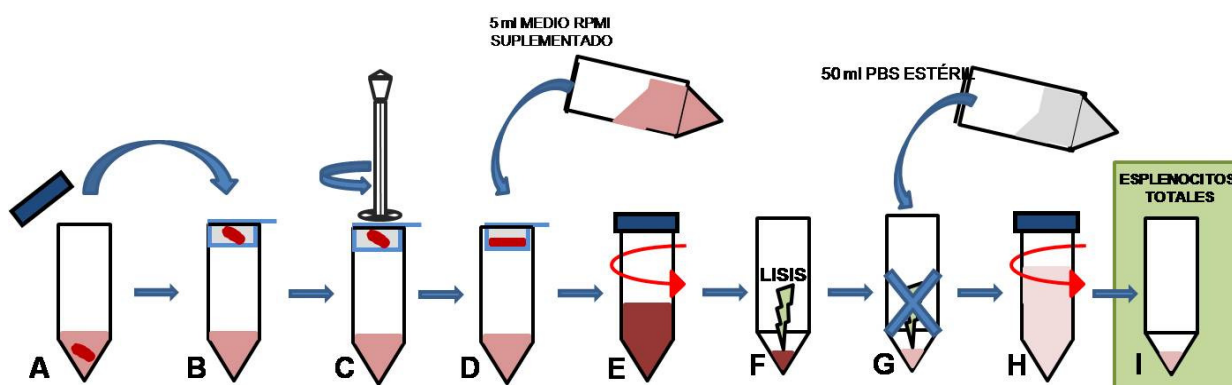


Figura 7: Esquema del procesamiento de un bazo para la obtención de los esplenocitos totales. El bazo (rojo) extraído y sumergido en medio RPMI (A) se homogeneiza mecánicamente con el embolo de una jeringuilla sobre un filtro (B,C). A continuación, agregamos medio RPMI para facilitar la caída de las células al tubo falcon (D), acto seguido, la muestra se centrifuga (E) y se lleva a cabo la lisis de los eritrocitos añadiendo 1 ml de tampón de lisis (F). La reacción se para con PBS 1X estéril (cruz en G) y finalmente se centrifuga (H), obteniéndose un pellet compuesto por los esplenocitos totales del bazo (I).

9. Inmunocitoquímica para el análisis de las poblaciones celulares procedentes del bazo

Para el análisis por citometría de flujo de las poblaciones celulares de los ratones *sham* y EAE, se extrajeron y procesaron sus bazo, justo antes del inicio de la fijación. De cada suspensión de células obtenida, se añadieron 10^6 células/pocillo, en 6 pocillos de una placa de 96 con fondo en V (Sardted). A continuación, se bloquearon las uniones inespecíficas de los receptores Fc mediante la incubación de las células durante 10 minutos con los anticuerpos CD16/CD32 en PBS que contenía 2% de SBF, 2% de Albúmina de Suero Bovino (BSA, Sigma), 0,1 % de azida sódica (Sigma) y 2% de p/s (PBS para inmunocitoquímica). Posteriormente, se realizó el marcaje de superficie con la mezcla de anticuerpos en PBS para inmunocitoquímica (Tabla 5), anti-CD11b-PerCP, anti-Ly6G-FITC y anti-Ly6G-PE a 3 de los pocillos y anti-CD3-PB, anti-CD4-PE y anti-CD8-FITC, a los 3 pocillos restantes. Se incubaron durante 30 minutos, a 4°C , protegidos de la luz. Tras la incubación, y para eliminar el exceso de anticuerpo, se lavó con 200 μl de PBS para

inmunocitoquímica y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. A continuación, se decantó el sobrenadante y se recogieron las células resuspendidas en 400 µl de PBS para inmunocitoquímica en tubos, para proceder a su adquisición en el citómetro de flujo FACS Aria (BD, Biosciences) y su posterior análisis con el software FACS Diva 6.1.

Tabla 5: Anticuerpos usados para citometría de flujo.

Anticuerpo	Fluoróforo asociado	Diana	Tipo
CD11b	<i>Proteína clorofílica de Peridinium (PercP)</i>	Macrófagos/microglía	Rata
CD3	<i>-Pacific Blue (PB)</i> <i>-Isotiocianato de fluoresceína (FITC)</i>	Linfocitos CD3 ⁺	Hámster
CD4	<i>Ficoeritrina (PE)</i>	Linfocitos CD4 ⁺	Rata
CD8	<i>Isotiocianato de fluoresceína (FITC)</i>	Linfocitos CD8 ⁺	Rata
Ly6C*	<i>Isotiocianato de fluoresceína (FITC)</i>	Monocitos	Rata
Ly6G*	<i>Ficoeritrina (PE)</i>	Granulocitos	Rata
CD3	Purificado	Receptor CD3 de los linfocitos T	Ratón
CD28	Purificado	Receptor CD28 de los linfocitos T	Ratón
CD16/CD32	Purificado	Receptor Fc	Ratón

Todos los anticuerpos son procedentes de BD Biosciences, menos los marcados con * que proceden de eBiosciences.

10. Aislamiento y estimulación de los linfocitos T procedentes del bazo

Para el aislado de linfocitos T, se procesó el bazo de un ratón C57BL/6J control como se describe previamente en el apartado anterior. La suspensión de células obtenida se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y se aspiró el sobrenadante. Para bloquear las uniones inespecíficas de los receptores Fc, el pellet de células se incubó durante, 10 minutos, con los anticuerpos CD16/CD32 (BD, Biosciences) en PBS, con 2% de SBF y un

1% p/s (PBS suplementado). Posteriormente, se realizó el marcaje de superficie para detectar la población de linfocitos T CD3⁺ añadiendo el anticuerpo anti-CD3-FITC (Tabla 5) en PBS suplementado y se incubó durante 30 minutos, a 4°C, protegido de la luz. Tras la incubación, y para eliminar el exceso de anticuerpo, se lavó con 200 µl de PBS suplementado y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. Después se decantó el sobrenadante y se recogieron las células resuspendidas en 400 µl de PBS suplementado y se procedió al aislamiento de los linfocitos T CD3⁺ en el citómetro FACS Aria (BD, Bioscience) con una pureza de aislamiento mayor del 95%.

La estimulación de los linfocitos T se realizó con los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (Tabla 5) ambos a una concentración de 1 µg/ml en PBS estéril. Ambos anticuerpos fueron inmovilizados sobre una placa de 96 pocillos de fondo plano (Sarstedt), durante 3 horas, a 37°C. Transcurrido ese tiempo, los pocillos se lavaron dos veces con medio RPMI para eliminar el exceso de anticuerpo. Posteriormente, se dispusieron 2x10⁵ células/pocillo tratado o no con anti-CD3 y anti-CD28 y se cultivaron durante 24 horas, a 37°C.

11. Obtención de células infiltradas de las médulas espinales y separación por citometría de flujo de las Células Supresoras Derivadas de Mieloides

Las células infiltradas en la médula espinal se aislaron mediante la utilización de un gradiente de Percoll (Fig. 8). Para ello, fueron necesarios 4 animales inmunizados con MOG con una escala clínica entre 3-3,5 y 4 animales *sham*. Los animales fueron perfundidos con PBS estéril y las médulas espinales fueron extraídas por extrusión. Cada médula extraída se introdujo en un tubo eppendorf de 2 ml que contenía HBSS CaCl₂⁺/MgCl₂⁺ (HBSS^{+/+}; Gibco) frío, y se introdujeron en la campana de flujo laminar para seguir con su procesamiento. A continuación, las médulas espinales fueron situadas en una placa Petri una a una para ser cortadas con un bisturí en piezas pequeñas y después se introdujeron en un tubo eppendorf que contenía 2 ml de HBSS CaCl₂⁻/MgCl₂⁻ (Gibco), a los cuales se había añadido 400 U/médula espinal de collagenasa tipo IV (Sigma), 100 mM CaCl₂ (Sigma) y 0,01 % de

DNAasa (Sigma). Para favorecer la digestión enzimática, los tubos eppendorf fueron introducidos durante 45 minutos a 37°C y en agitación en el *termoblock*. Posteriormente, se homogeneizó mecánicamente el tejido haciéndolo pasar por una jeringuilla de 2,5 ml con una aguja de 25 G. Las dos suspensiones celulares obtenidas, procedentes cada una de las cuatro médulas espinales de los ratones con EAE y *sham*, se filtraron, cada una, a través de un filtro de 40 µm de diámetro de poro, situados en un tubo falcon de 50 ml que contenía 10 ml de HBSS^{+/+} (Gibco) frío. A continuación, las muestras se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. En el tiempo de centrifugado, se procedió a la preparación de las diluciones de 30% y 70% de Percoll (Sigma) en PBS 1X estéril con las que se realizó el gradiente. Para preparar estos gradientes fue necesario realizar unas horas antes un stock iso-osmótico de Percoll (SIP) que contenía Percoll (Sigma) 1:10 en PBS 10X estéril atemperado. Las diluciones de Percoll al 30 y 70% contenían SIP en PBS 1X estéril mantenido a TA en ambos casos.

Finalizados los 5 minutos de centrifugación, cada pellet se resuspendió en 1 ml de SIP al 70% y se procedió a preparar cuatro tubos de gradiente, dos tubos para las médulas espinales de los ratones con EAE y otros dos tubos para las de los ratones *sham* (1 tubo por cada dos médulas espinales). En cada tubo se introdujo un 1 ml de SIP al 70%, 1,5 ml de SIP al 30%, 0,5 ml de PBS y 0,5 ml de la muestra resuspendida en SIP al 70%. A continuación, se centrifugaron a 2600 rpm durante 30 minutos, sin freno. La mielina fue eliminada de la parte superior de los tubos y las células inflamatorias fueron retiradas de la interfase 30/70%. La suspensión celular obtenida se filtró a través de un filtro (BD Biosciences) con un tamaño de poro de 70 µm y se lavaron en PBS suplementado, a TA. Después de centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos, se bloquearon los receptores Fc, de la manera descrita anteriormente. Posteriormente, la suspensión de células se marcó con una solución de PBS suplementado que contenía los siguientes anticuerpos: anti-CD3-PB, anti-Ly6C-FITC, anti-Ly6G-PE, anti-CD11b-PerCP (Tabla 5).

Todas las muestras se analizaron en el citómetro FACS Aria, utilizando el software FACS Diva 6.1. La población de células Ly6C^{high}/Ly6G^{-low} de los ratones con EAE fue

aislada mediante citometría de flujo, en condiciones de baja presión (a 20 psi, del inglés *pounds per square inch*, y boquilla de 100 μm), de la población de células $\text{CD3}^-/\text{CD11b}^+$, con una pureza en el proceso de separación mayor del 95%. Finalizada la separación, se repartieron las células en los pocillos de una placa de 96 con fondo plano (1×10^5 células/pocillo) para proceder al co-cultivo de éstas con los linfocitos T.

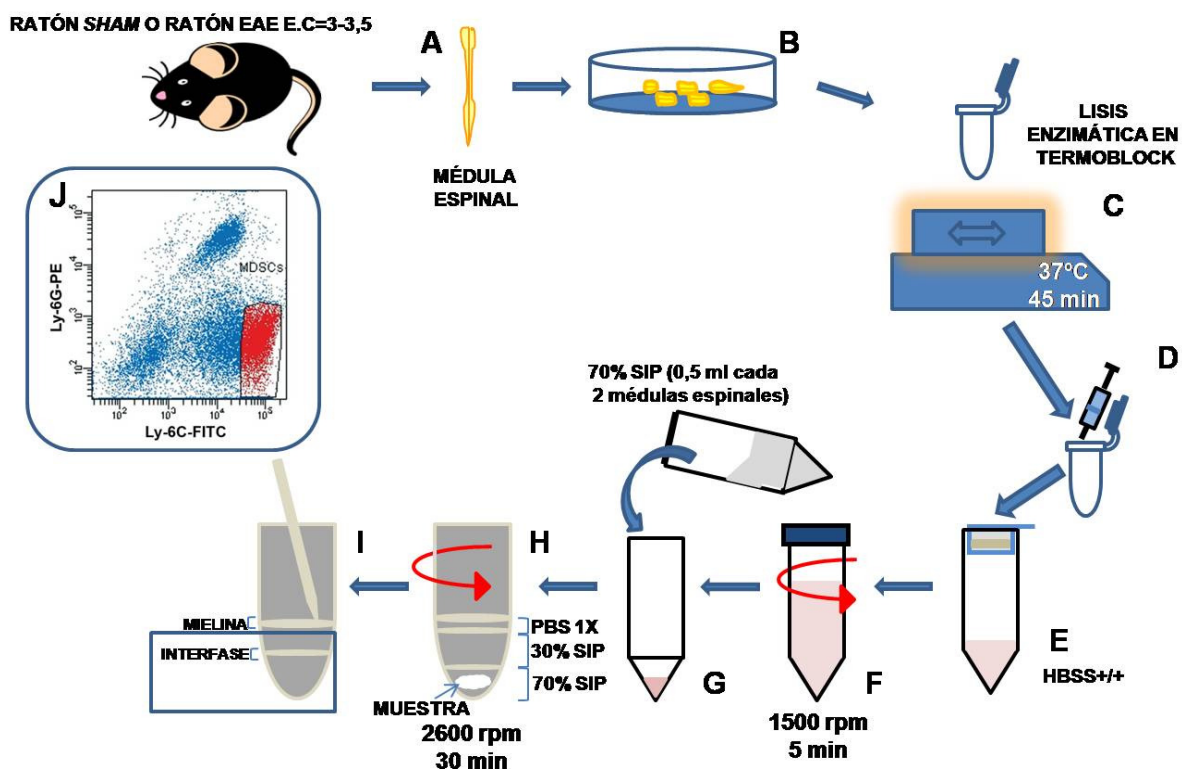


Figura 8: Procesamiento de una médula espinal para el aislamiento por citometría de flujo de las células infiltradas en la médula espinal de los ratones *sham* y con EAE. Tras la extracción de la médula espinal (A), ésta se trocea con un bisturí (B), se realiza la digestión enzimática en el termoblock (C). A continuación, se homogeneiza haciendo pasar la muestra por una aguja al interior de una jeringa (D), se filtra la muestra (E), se centrifuga (F) y se resuspende el pellet en SIP al 70% (G). Finalmente, la muestra se añade al tubo con el gradiente de Percoll y se centrifuga (H). La mielina es retirada y se lavan las células infiltradas (I). Tras el marcado de la muestra se realiza la separación de las MDSCs mediante citometría de flujo (J).

12. Co-cultivo de linfocitos T y de Células Supresoras Derivadas de Mieloides

Los linfocitos T CD3⁺ estimulados o no con anti-CD3 y anti-CD28 aislados del bazo de un animal control (apartado 10) se co-cultivaron con las MDSCs extraídas de cuatro ratones con una escala clínica de 3-3,5 (apartado 11; Fig. 8). Un día después de la estimulación de los linfocitos T, se realizó el aislamiento de las MDSCs. Pasado el tiempo de estimulación de los linfocitos T con CD3/CD28 (2×10^5 células/pocillo), las MDSCs se expusieron a los linfocitos T estimulados o no (relación linfocitos/MDSCs 2:1), durante 48 horas. Las células se recogieron en tubos eppendorf y se lavaron dos veces con PBS suplementado (se centrifugó entre los lavados a 1500 rpm durante 5 minutos; Fig. 9).

Se bloquearon las uniones inespecíficas de los receptores Fc (ver apartado 10) y se marcó con el anticuerpo anti-CD3-APC durante 30 minutos, a 4°C. Para eliminar el exceso de anticuerpo, se lavó en PBS para inmunocitoquímica dos veces y centrifugándose a 1500 rpm durante 5 minutos, entre cada lavado. El pellet se resuspendió en 300 µl de PBS estéril y se pasó cada muestra a un tubo falcon de 15 ml. A continuación, los tubos fueron agitados en un vórtex y se fijaron con 700 µl de etanol al 70%, a -20°C, que se fue dejando caer gota a gota. Las muestras se guardaron a -20°C y al día siguiente se marcaron con Ioduro de Propidio (Immunostep), siguiendo las instrucciones del fabricante. La adquisición de las células se realizó en el citómetro de flujo FACS Canto II, capturando para cada muestra 30.000 eventos, y el ciclo celular se analizó con el software FACS Diva 6.1.

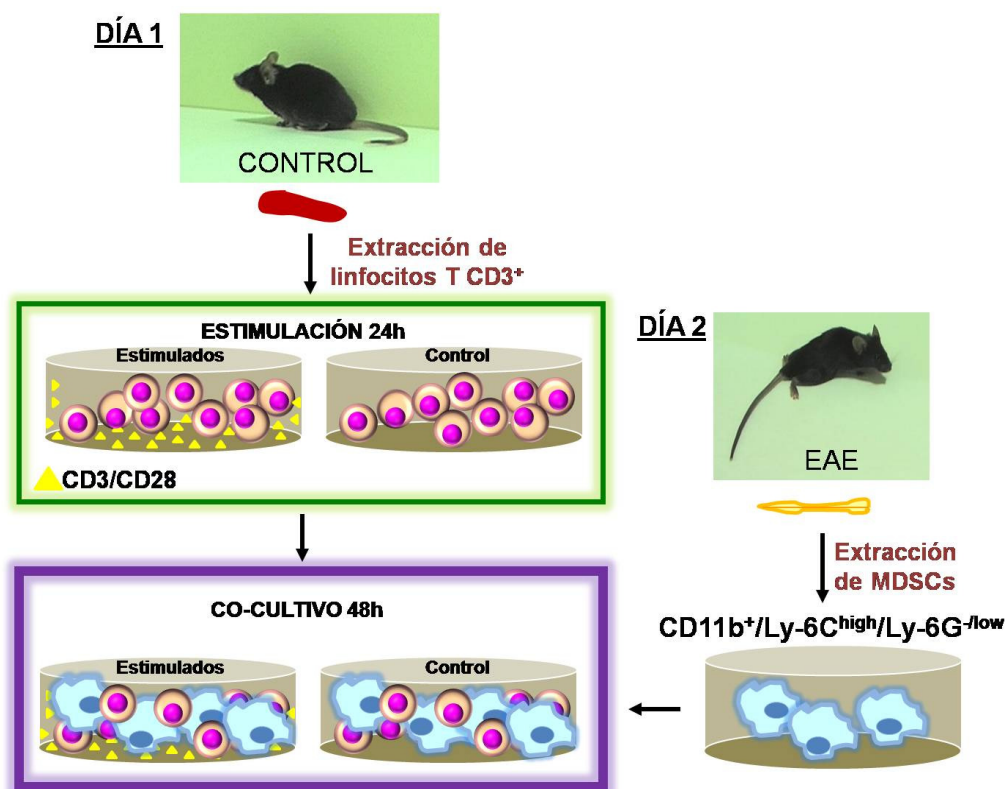


Figura 9: Esquema de un co-cultivo de MDSCs con linfocitos T. Día 1: Se procesa un bazo procedente de un ratón control y se aíslan los linfocitos T mediante citometría de flujo. A continuación, se realiza la estimulación de los linfocitos T durante 24h (cuadro en verde) con anti- CD3 y anti-CD28. **Día 2:** Pasadas 24 horas de la obtención de los linfocitos T y de su estimulación, se lleva a cabo la extracción de las MDSCs procedentes de las médulas espinales de 4 ratones EAE con una escala clínica de 3-3,5. Una vez obtenidas las MDSCs de la médula espinal, se ponen en contacto con los linfocitos T estimulados o control durante 24h. El co-cultivo tiene una duración de 48h (cuadro en violeta).

13. Análisis cuantitativo del tejido

Para cada uno de los periodos experimentales estudiados se analizaron 12 secciones de 20 μm de grosor por animal a lo largo de su médula torácica, con una separación entre ellas de 340 μm . Por tanto, se analizó un total de 1,36 mm de longitud de médula torácica.

El recuento del número de células, identificadas por inmunofluorescencia, se realizó mediante la adquisición de microfotografías del área infiltrada en un microscopio confocal SP5 (Leica). Para evitar falsos recuentos o repeticiones, se tomaron 12 planos/foto a lo largo de las 20 μm de grosor del tejido con una separación entre planos de 1 μm y una resolución de 1024 x 1024 píxeles. No se observó cruce de señales entre los canales (se comprobó

utilizando cada fluorocromo por separado). Para la medida de las áreas infiltradas y de la superficie total de la médula espinal se empleó la aplicación *Image J*. Para la medida de las distancias entre las células Arg-1 y los linfocitos apoptóticos se usó la aplicación Leica 2.7.0 R1.

14. Análisis de citometría de flujo

El análisis se realizó con el software FACS Diva 6.1 (BD Biosciences). Se seleccionó una región P1 correspondiente a la población total de células, mediante las características de dispersión frontal de la luz (FSC; del inglés, *Forward Light-Scatter*) y dispersión octogonal de la luz (SSC; del inglés, *Side Liht-Scatter*) de las células. Para la adquisición y análisis de las subpoblaciones celulares y de sus moléculas de superficie, se utilizaron 30.000 eventos (o células) procedentes de dicha región. Para el análisis de las MDSCs, se tomó la región correspondiente a las células CD11b⁺/CD3⁻ y, de ella se analizaron las células según la expresión de los marcadores Ly-6C y Ly-6G. Los eventos fueron presentados en gráficas de *dot plot* e histogramas.

15. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SigmaStat (Jandel Scientific). Los datos se expresaron a lo largo del trabajo como la media \pm error estándar de la media (SEM). Para la comparación entre los grupos, se utilizó el test de la *t* de Student o su correspondiente test por rangos para muestras no normalizadas. Para los análisis de correlación se empleó el test de correlación de Pearson. El nivel mínimo de significación estadística fue de $p < 0,05$, estableciéndose los siguientes grados de significación: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

RESULTADOS

A. Caracterización de las Células Supresoras Derivadas de Mieloides en el modelo de EAE

Presencia de células Arginasa-I en médula espinal de ratones con EAE

Para determinar la expresión de Arg-I en la médula espinal de los ratones *sham* y EAE, se realizó el inmunomarcaje con Arg-I en los diferentes periodos experimentales (Fig. 10): 15 dpi (final del periodo de incremento de los síntomas clínicos), 25 dpi (final del periodo de recuperación parcial de los síntomas clínicos), 35 y 63 dpi (inicio y final del periodo crónico de la EAE respectivamente).

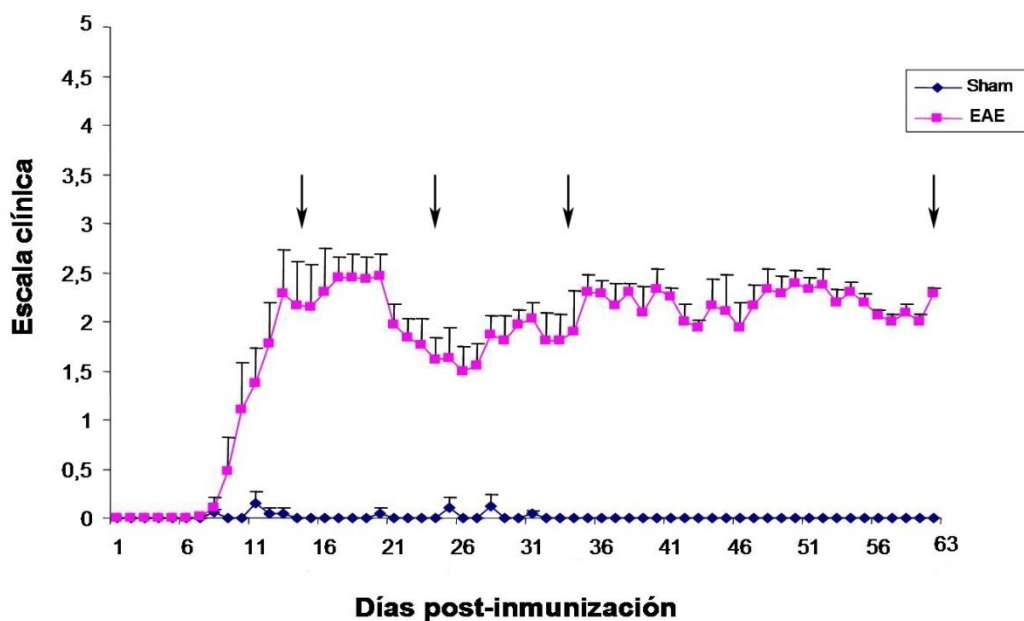


Figura 10: Evolución clínica de la EAE. Las flechas indican los periodos experimentales estudiados: 15 dpi (final del periodo de incremento de los síntomas clínicos), 25 dpi (final del periodo de recuperación parcial de los síntomas clínicos), 35 y 63 dpi (inicio y final del periodo crónico de la EAE).

Las médulas espinales de los ratones *sham* y control carecían de áreas desmielinizadas, así como de marcaje para Arg-I en todos los periodos experimentales estudiados (Fig. 11A,C). Por el contrario, los ratones con EAE presentaron áreas desmielinizadas en todos los periodos experimentales. Además, estos animales exhibieron marcaje para Arg-I, que sólo fue observado en los periodos experimentales correspondientes a 15 y 25 dpi. El marcaje presentó una distribución espacial muy definida, localizándose principalmente en las células infiltradas del área desmielinizada, y de la periplaca circundante, sin que se observara marcaje alguno en la sustancia gris (Fig. 11B,D).

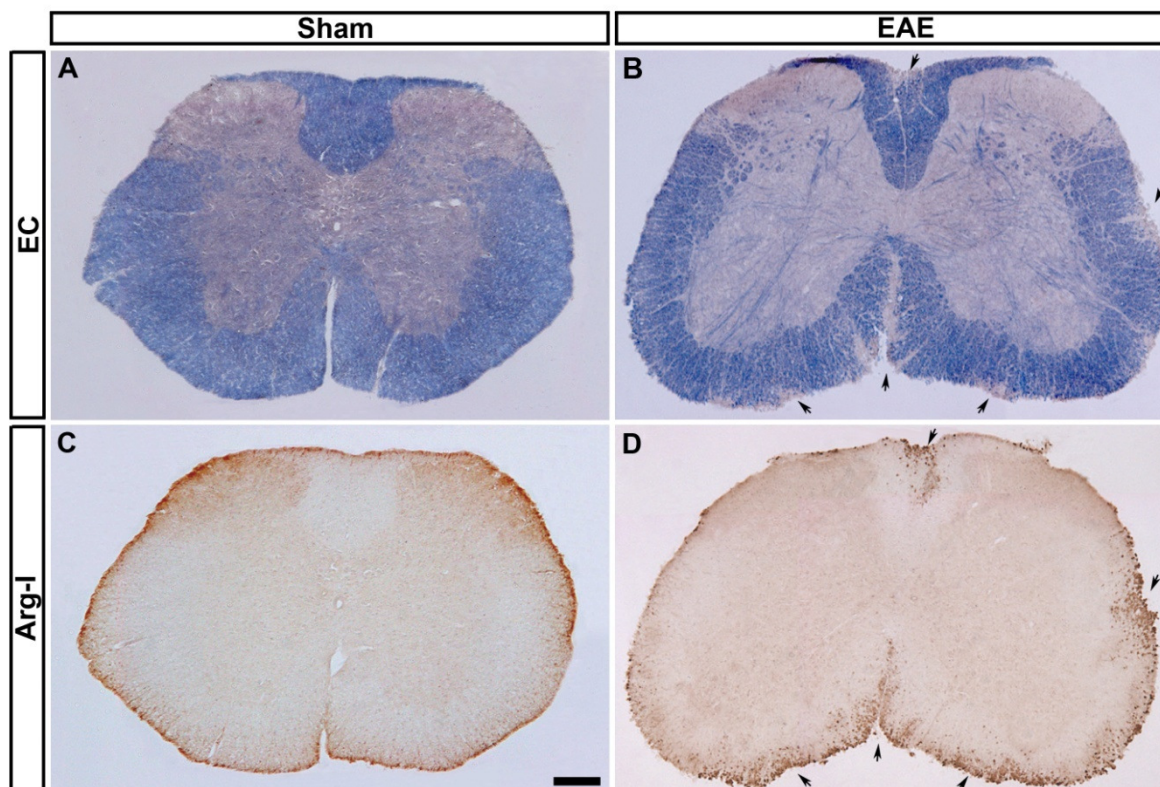


Figura 11: Presencia y localización de las células Arg-I⁺ en la médula espinal de los ratones *sham* y EAE. Microfotografías panorámicas de la médula espinal de ratones *sham* (A,C) y de ratones con EAE a 15 dpi (B,D; escala clínica: 3). Las células Arg-I⁺ están exclusivamente asociadas al área de desmielinización de los animales con EAE (flechas en B y D) y no se observan en animales *sham* (C). La barra de escala representa 110 μ m en A-D.

Las células inmunomarcadas con Arg-I tenían formas que oscilaron entre redondeadas y poligonales, con un diámetro medio de $7,78 \pm 0,15 \mu\text{m}$ y, frecuentemente, citoplasmas vacuolados (Fig. 12).

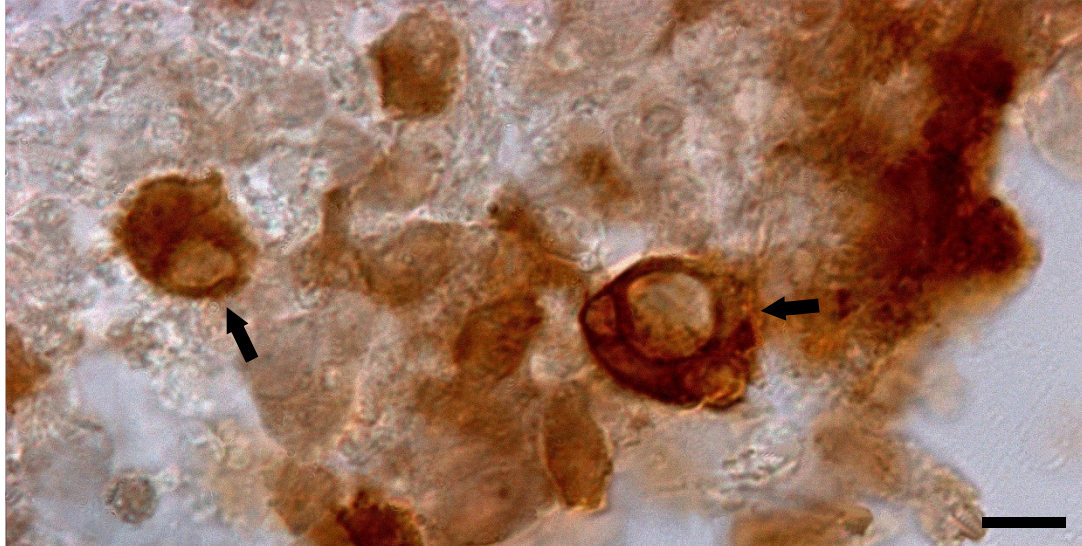


Figura 12: Morfología de las células Arg-I⁺. Detalle de dos células Arg-I⁺ (flechas) localizadas en el área desmielinizada de un ratón con EAE a 15 dpi (escala clínica: 3). La barra de escala representa 5 μm .

Distribución espacio-temporal de las células Arginasa-I en la EAE

Como ya hemos indicado anteriormente, las células Arg-I⁺ no estaban presentes en los ratones *sham* (Fig. 11A-C; Fig. 13A,B) y en los ratones con EAE se vieron sólo circunscritas a las áreas desmielinizadas infiltradas, exclusivamente en los periodos clave de la modulación de la respuesta inmune (a 15 y 25 dpi; Fig. 13C-F), mientras que desaparecían en el inicio y final del periodo crónico (Fig. 13G-J). La densidad de las células Arg-I⁺ fue significativamente mayor a 15 que a 25 dpi, tanto con respecto al área desmielinizada, como al área total de la médula espinal (Fig. 13K-L). Este patrón de expresión espacio-temporal mostró un paralelismo con el curso clínico de la EAE (Fig. 10), donde la mayor densidad de células Arg-I⁺ se observó en el momento de mayor afectación clínica de los ratones a 15 dpi (valor clínico medio: 2,5), disminuyendo a 25 dpi (valor clínico medio: 1,5), no siendo observadas en ninguno de los dos periodos analizados de la fase crónica (35 y 63 dpi).

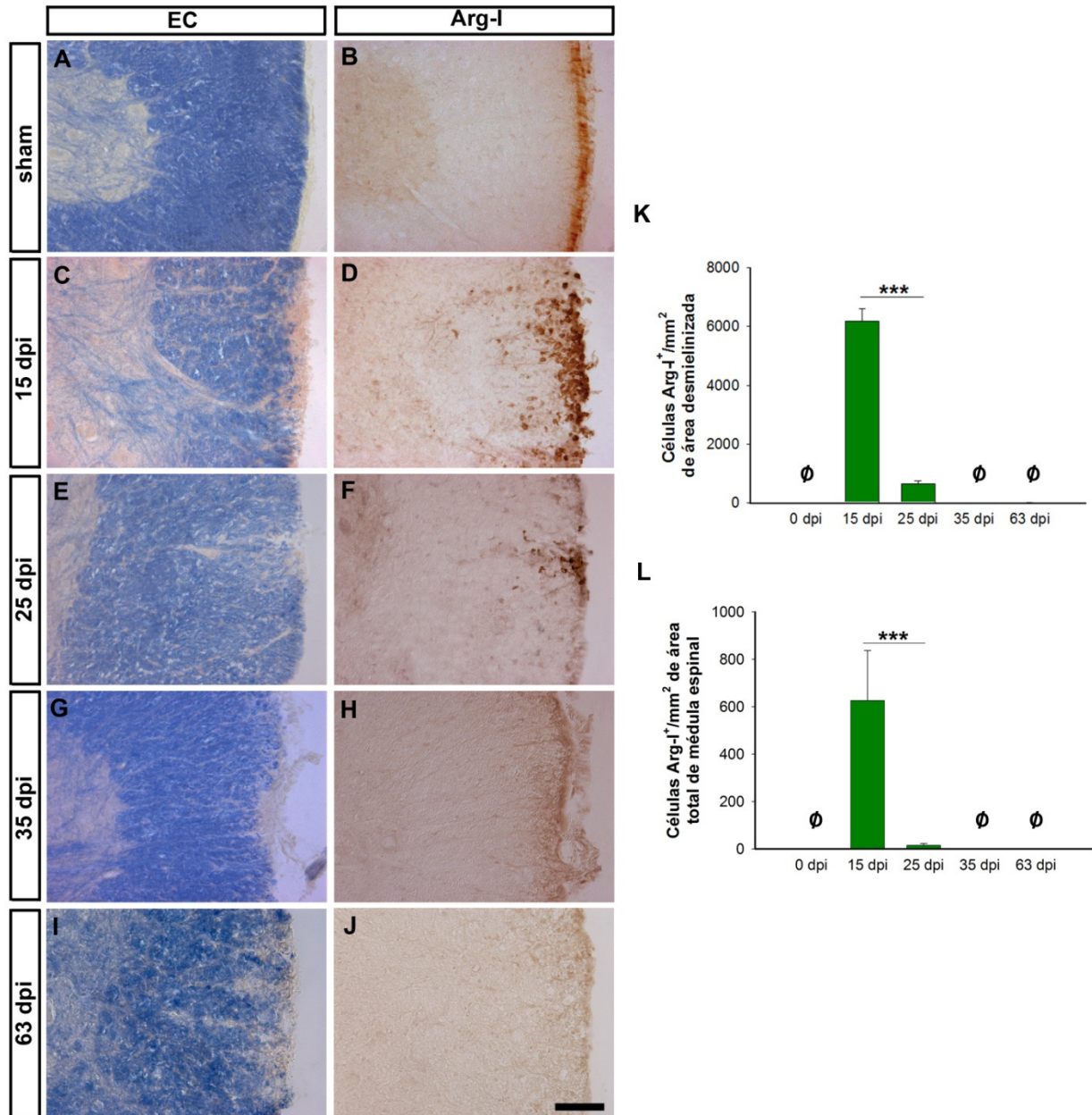


Figura 13: Distribución espacio-temporal de Arg-1 durante el curso clínico de la EAE. Detalle de la zona desmielinizada con eriocromo cianina-EC (A,C,E,G,I), en paralelo con Arg-1 (B,D,F,H,J) tanto para animales *sham* (A-B) como para los animales con EAE a 15 dpi (C-D), 25 dpi (E-F), 35 dpi (G-H) y 63 dpi (I-J). Las células Arg-1⁺ están presentes exclusivamente en las zonas desmielinizadas a 15 y 25 dpi (C-F), siendo ausentes en los periodos crónicos 35 y 63 dpi (G-J). El recuento del número total de células Arg-1⁺ con respecto al área desmielinizada (K) y a la superficie total de la médula espinal (L) muestra que la densidad de las células Arg-1⁺ es máximo a 15 dpi, se reduce significativamente a 25 dpi y desaparece de 35 dpi en adelante. Ø: No se observaron células. Para los grupos en los que las células Arg-1⁺ están presentes se realizó un test de la *t* de Student con valor de *p* significativo de ****p*<0,001. La barra de escala representa 50 µm en A-J.

Las células Arginasa-I presentan características de Células Supresoras Derivadas de Mieloides (MDSCs)

Las MDSCs han sido caracterizadas en diferentes enfermedades por la expresión de los marcadores CD11b y Gr-1 (ambos característicos de células mieloides y que permiten distinguir entre microglía/macrófagos y granulocitos, respectivamente), lo que les confiere a estas células un fenotipo inmaduro de la estirpe mieloides (Kusmartsev et al., 2000; Makarenkova et al., 2006; Gabrilovich y Nagaraj, 2009; Peranzoni et al., 2010). Para comprobar si las células Arg-1⁺ presentes en el tejido tenían el fenotipo de MDSC, se realizó una doble inmunofluorescencia para Arg-1 y los marcadores CD11b y Gr-1 en las médulas espinales de los ratones con EAE en los periodos en los que las células Arg-1⁺ estaban presentes (15 y 25 dpi), así como en los ratones *sham*. Los ratones *sham*, al igual que ocurría con la expresión de Arg-1, carecían de marcaje para Gr-1 en todos los periodos experimentales estudiados (Fig. 14A-C). En cambio, en los ratones con EAE, Gr-1 estaba presente en los mismos periodos en los que aparecieron las células Arg-1⁺, asociadas al área desmielinizada e, igualmente que para Arg-1, la expresión de Gr-1 desaparecía a 35 y 63 dpi (Fig. 15A-P).

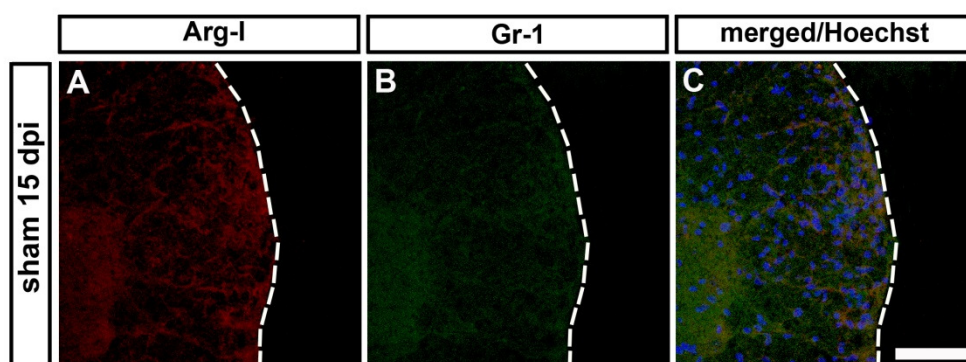


Figura 14: Los ratones *sham* carecen de expresión de Gr-1. Microfotografías de una zona parcial de la médula espinal de un ratón *sham* a 15 dpi, en el que no se observa presencia de células Arg-1⁺ (A) ni de células Gr-1⁺ (B). En C se muestra la superposición de ambos marcadores junto Hoechst como marcador nuclear. La barra de escala representa 60 μ m en A-C.

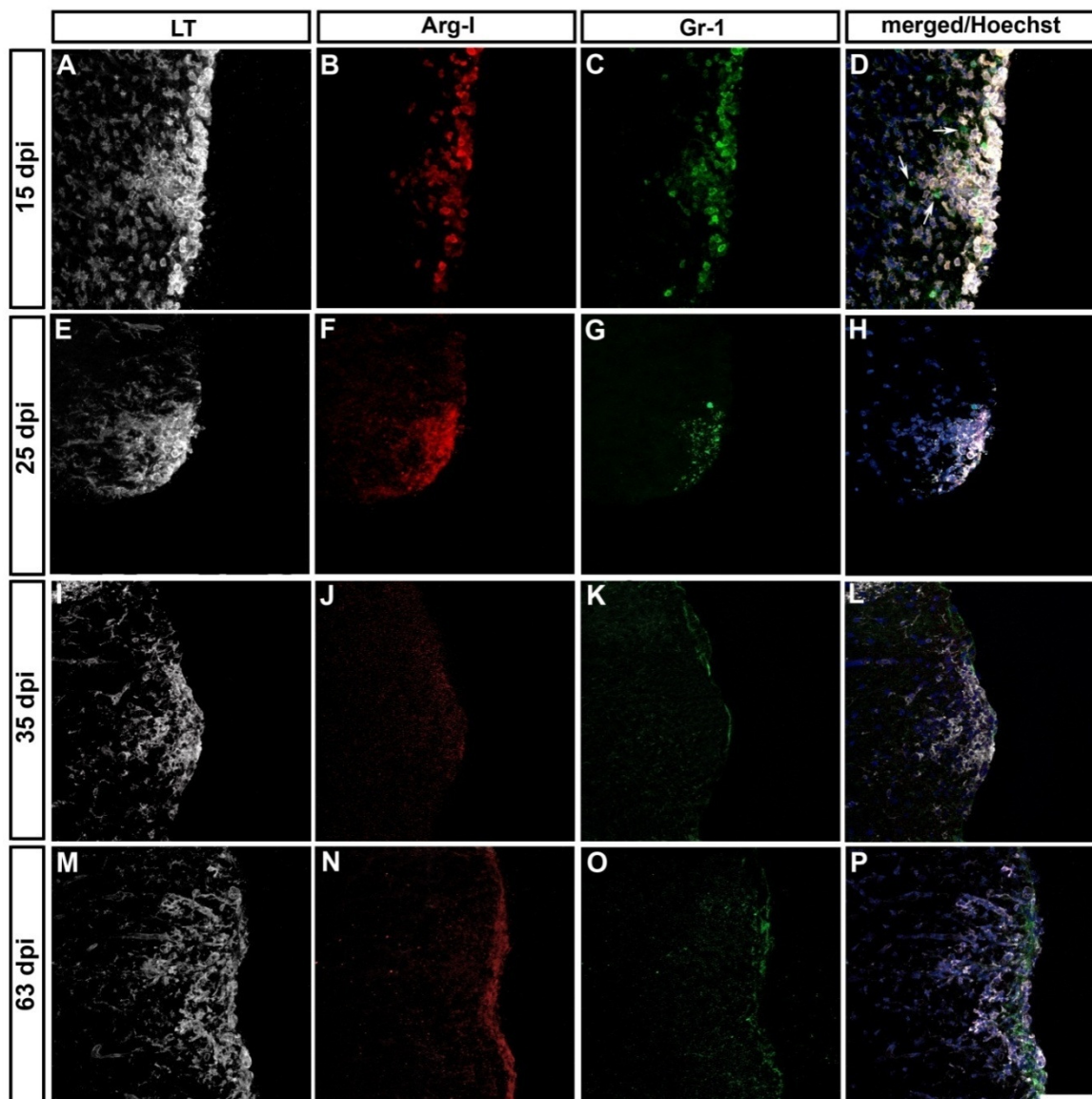


Figura 15: Expresión paralela de Gr-1 en células Arg-I⁺ en la médula espinal durante el curso temporal de la EAE. El marcaje con lectina de tomate (LT) permite observar la presencia del infiltrado inflamatorio en todos los periodos postinmunización analizados (**A,E,I,M**). Los patrones de inmunomarcaje para Arg-I (**B,F,J,N**) y Gr-1 (**C,G,K,O**) son paralelos durante el curso temporal de la EAE: abundantes a 15 dpi (**A-D**), escasos a 25 dpi (**E-H**) y ausentes por completo a 35 (**I-L**) y 63 dpi (**M-P**). El análisis de colocalización (**D,H,L,P**) junto con Hoechst muestra que las células Arg-I⁺ representan una subpoblación de células inflamatorias infiltradas Gr-1⁺. Además existe una pequeña población de células Arg-I⁻/Gr-1⁺ (flechas en **D**). La barra de escala representa 60 μ m en A-P.

Tanto a 15 como a 25 dpi, la población de células Arg-I⁺ comprendía una subpoblación de células Gr-1⁺, que mostró una intensidad para el marcador Gr-1 alta/media (Fig. 16A-C). La población de células Arg-I⁻/Gr-1⁺ mostraron un marcaje intenso para Gr-1 y su número era mucho menor en comparación a las células Arg-I⁺/Gr-1⁺ (Fig. 16B,C).

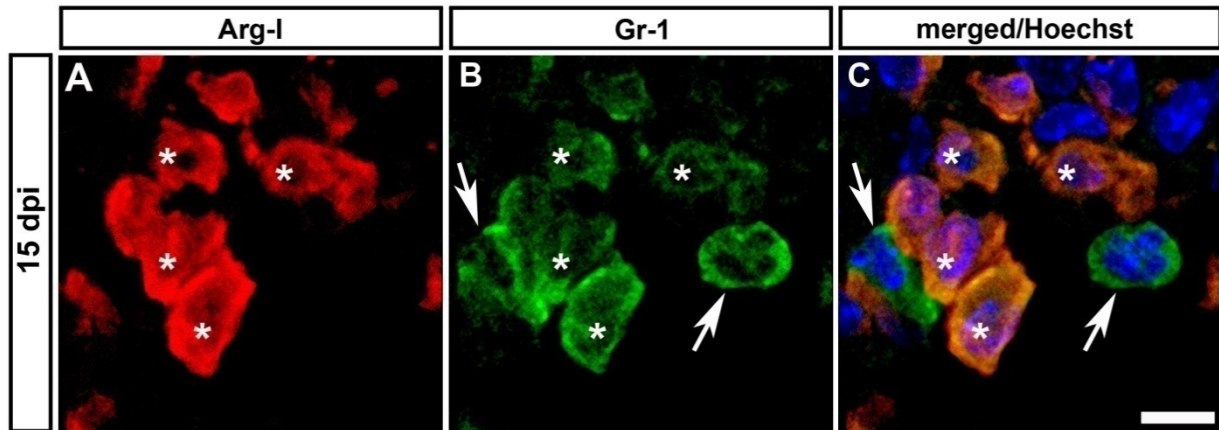


Figura 16: Subpoblaciones celulares de Gr-1 en el área desmielinizada. Detalle de las células de una zona desmielinizada de un ratón con EAE a 15 dpi (escala clínica: 3) inmunomarcado para Arg-1 (A) y Gr-1 (B). El análisis de colocalización junto con Hoechst como marcador nuclear muestra dos subpoblaciones de células: las células Arg-1⁺/Gr-1⁺ de intensidad de fluorescencia alta/media (asteriscos en A-C) y las células Arg-1⁺/Gr-1⁺, presentes en menor número, y de intensidad de fluorescencia alta (flechas en B-C). La barra de escala representa 7 μ m en A-C.

La cuantificación de las células Gr-1⁺ totales a 15 y 25 dpi mostró una densidad de estas células significativamente mayor a 15 que a 25 dpi (Fig. 17A). Sin embargo, el porcentaje de células Gr-1⁺ que exhibían inmunomarcaje para Arg-1 con respecto al total de células Gr-1⁺ no varió entre los dos periodos estudiados (Fig. 17B), lo que indicó que la subpoblación celular Arg-1⁺/Gr-1⁺ era la predominante en ambos tiempos experimentales.

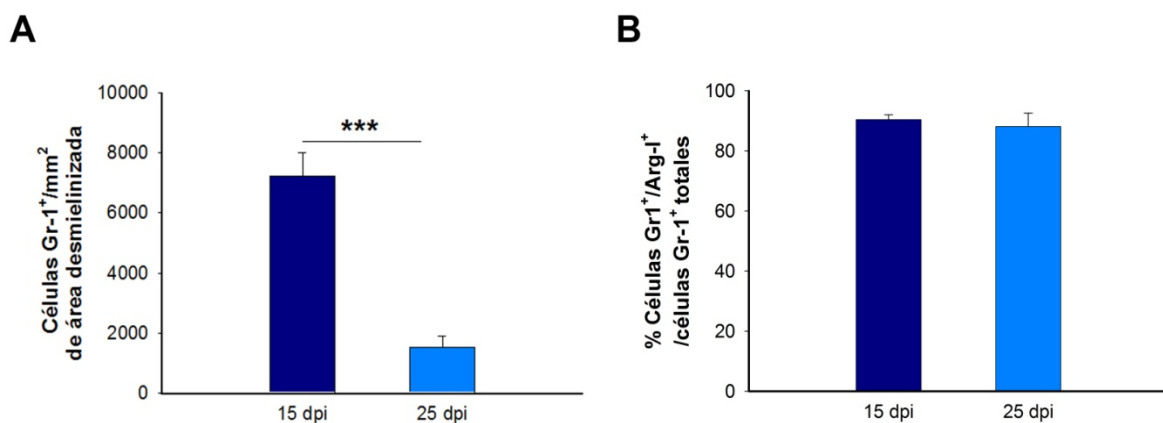


Figura 17: Cuantificación y clasificación de las células Gr-1⁺ a 15 y 25 dpi. La densidad de células Gr-1⁺ en el área desmielinizada es máximo a 15 dpi y se reduce significativamente a 25 dpi (A). El porcentaje de células Gr-1⁺ que presentan inmunomarcaje para Arg-1 del total de células Gr-1⁺ no sufre variaciones en los dos periodos en los que dichas células están presentes (B). Para los grupos analizados se ha realizado el test de la *t* de Student con valor de *p* significativo de ****p*<0,001.

El Receptor-1 del Factor de estimulación de Colonias de Macrófagos (M-CSF1R), conocido también como CD115, es considerado como un marcador adicional de MDSCs, que distingue específicamente a aquellas MDSCs con una función altamente supresora (Huang et al., 2006). El inmunomarcaje para CD11b y CD115 de las secciones de médula espinal en los ratones *sham*, en todos los periodos experimentales estudiados, mostró la presencia de ambos marcadores en las células de la médula espinal. Las características morfológicas encontradas en la células marcadas nos permitió clasificarlas como células de la microglía residente (Fig. 18A-F).

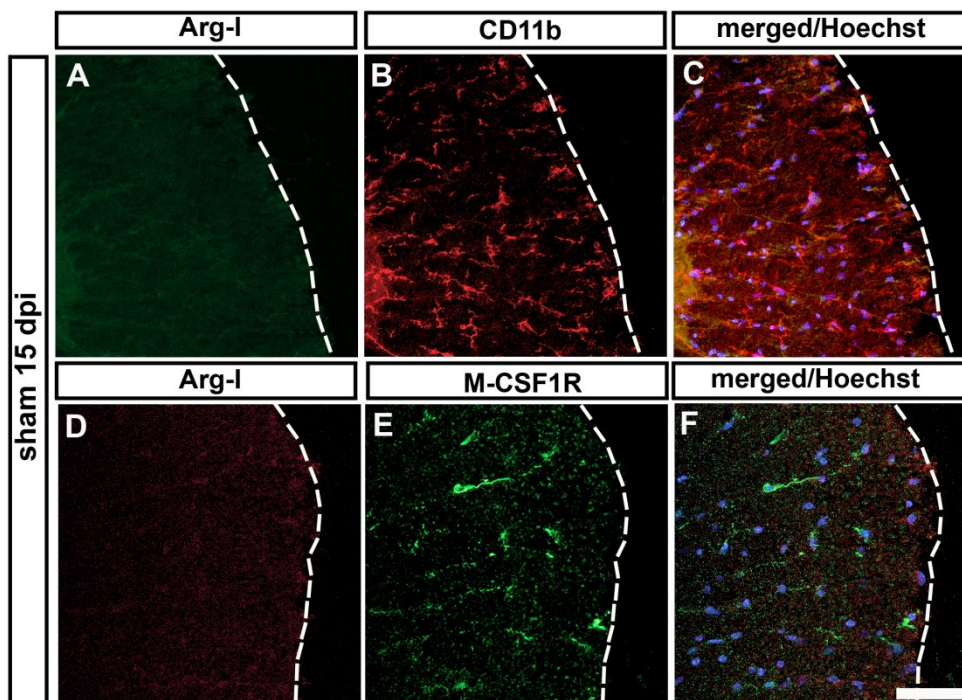


Figura 18: Los ratones *sham* presentan células CD11b⁺ y CD115⁺ en su médula espinal. El detalle parcial de la médula espinal de un ratón *sham* a 15 dpi muestra que estos ratones carecen de inmunomarcaje para Arg-I (A,D). En cambio, poseen células CD11b⁺ (B) y M-CSF1R⁺ (E) con características morfológicas típicas de microglía residente (merged y Hoechst C y F). La barra de escala representa 60 μ m en A-F.

Los ratones con EAE, al igual que los ratones *sham*, también mostraron marcaje para CD11b y CD115 localizado principalmente en las células infiltradas del área desmielinizada. Además, ambos marcadores mostraron co-expresión con las células Arg-I⁺, con un marcaje de intensidad variable, que permitió identificarlas como un infiltrado de macrófagos con propiedades altamente inmunosupresoras (Fig. 19A-C y Fig. 20A-C). La morfología de estas células fue muy variada, predominando las formas redondeadas y poligonales, así como con citoplasmas altamente vacuolados (Fig. 19D-F y Fig. 20D-F)

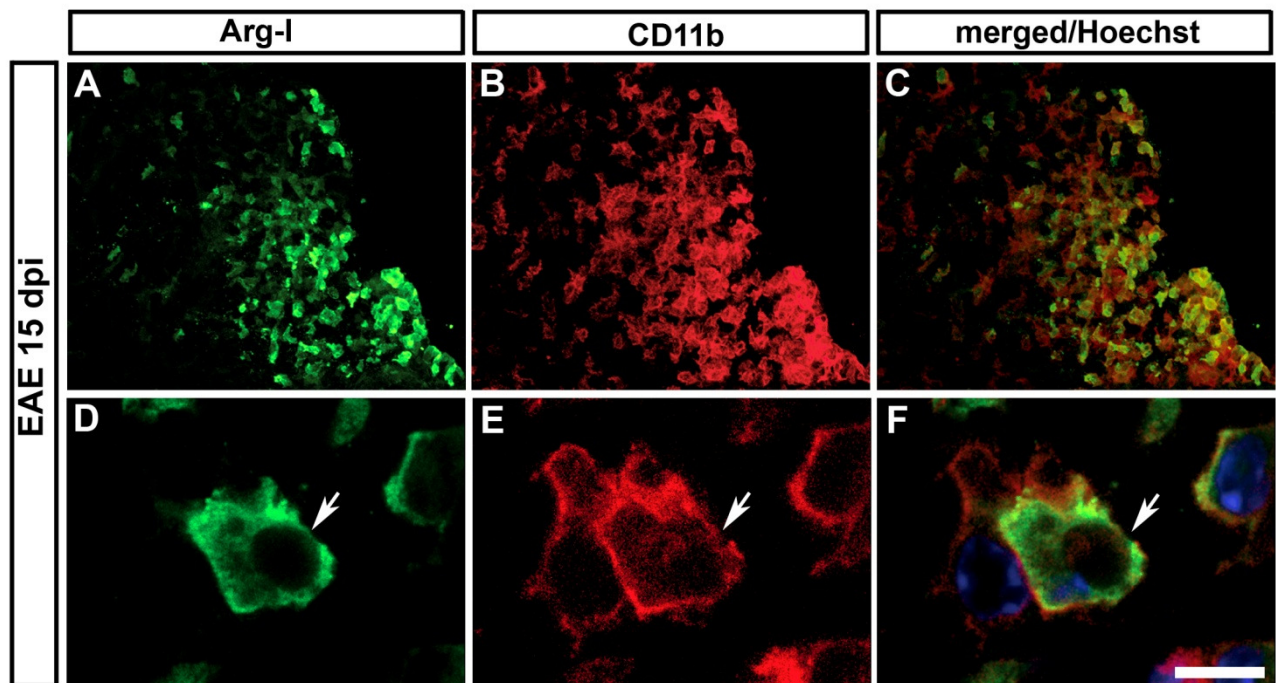


Figura 19: Las células Arg-I presentan inmunomarcaje para CD11b. Detalle de un infiltrado inflamatorio marcado para Arg-I (A) y CD11b (B), en una zona de desmielinización a 15 dpi (escala clínica: 3). C: El estudio de colocalización junto con Hoechst muestra que la totalidad de las células Arg-I⁺ presentan marcaje para CD11b. Detalle de una célula doblemente marcada (flecha) para Arg-I⁺ (D) y CD11b⁺ (E), con morfología típica de macrófago. La barra de escala representa 60 μ m en A-C y 7 μ m en D-F.

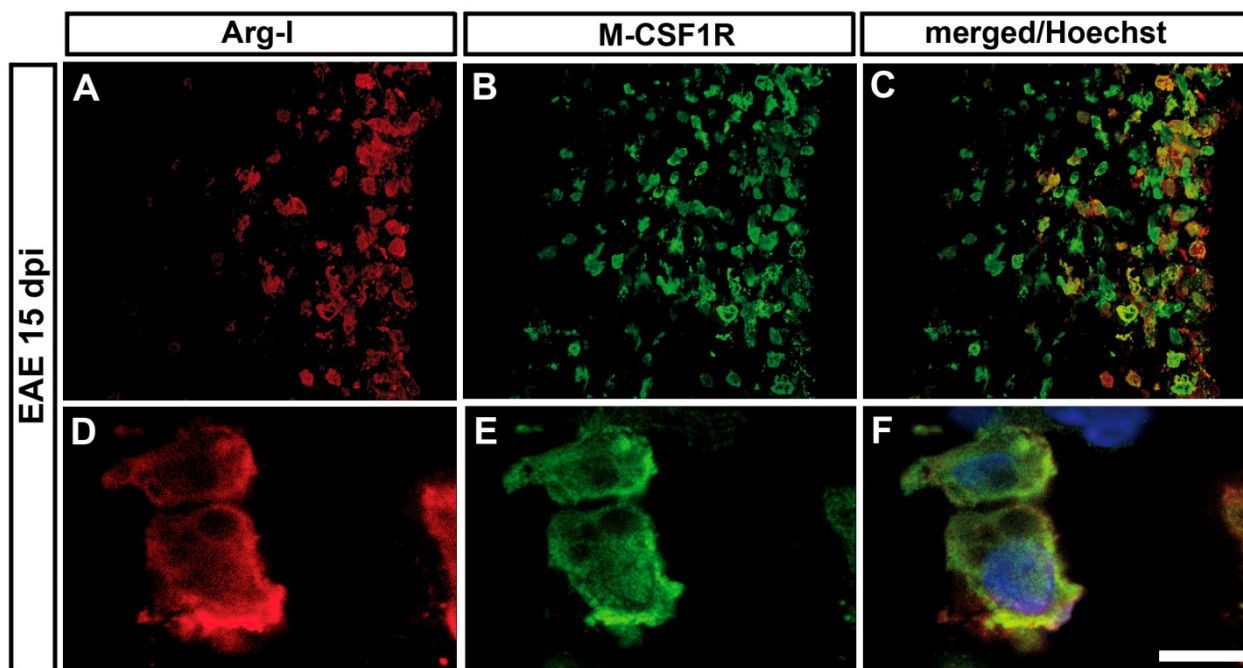


Figura 20: Las células Arg-I expresan el marcador CD115, específico de macrófagos supresores. Detalle del área desmielinizada a 15 dpi donde se muestra que las células Arg-I⁺ (A) suponen una subpoblación de células M-CSF1R⁺ (B-C). D-F: Macrófago en detalle inmunomarcado para Arg-I (rojo) y M-CSF1R (verde) y Hoechst (azul). La barra de escala representa 60 μ m en G-I y 4 μ m en J-L.

La densidad de las poblaciones celulares CD11b⁺ y CD115⁺ fue significativamente mayor a 15 dpi que a 25 dpi (Fig. 21A,B). Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en el porcentaje de células Arg-I⁺/CD11b⁺ respecto al total de células CD11b⁺, ni tampoco en el porcentaje de células Arg-I⁺/CD115⁺ respecto al total de células CD115⁺ entre ambos periodos experimentales (Fig. 21C,D), lo que indicaba que el fenotipo de las células Arg-I⁺ no varió entre ambos periodos.

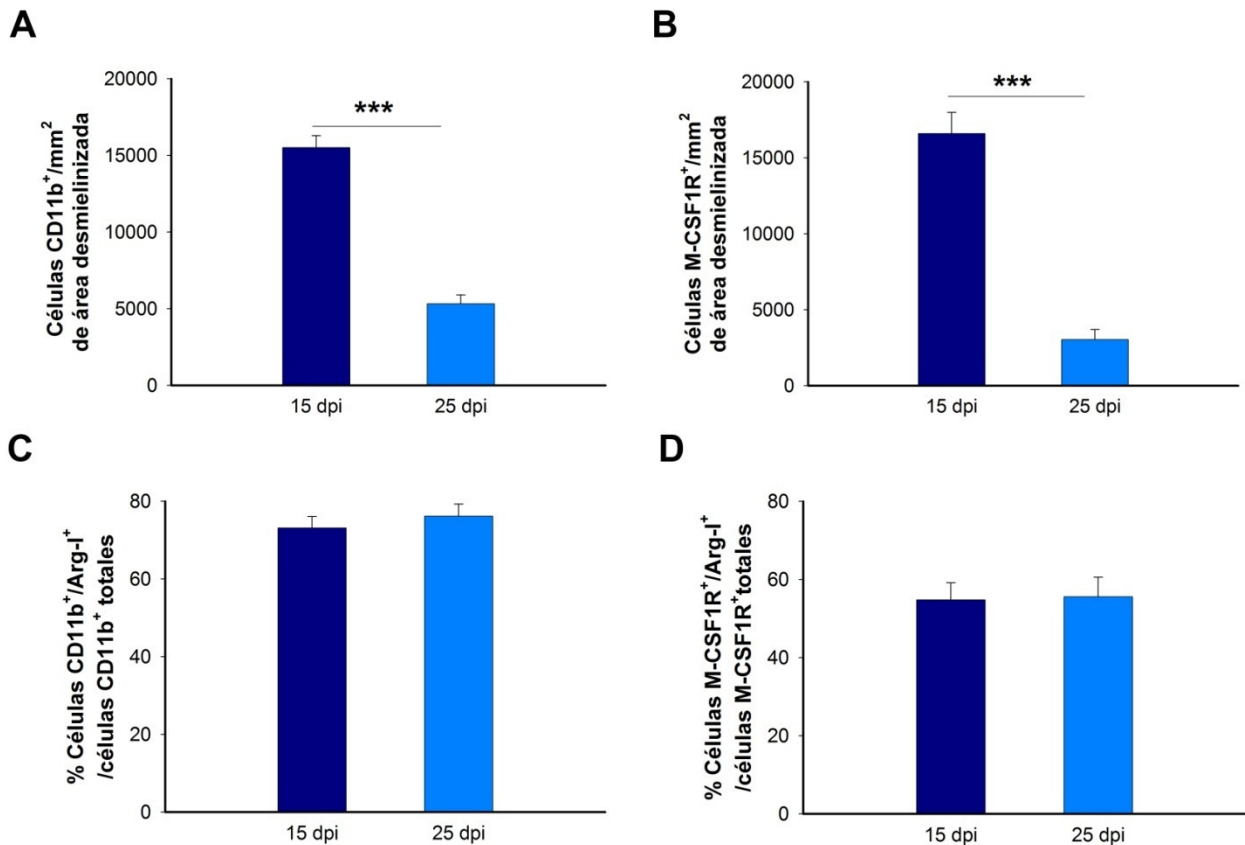


Figura 21: Las células CD11b⁺ y CD115⁺ que co-expresan Arg-I representan una subpoblación celular mayoritaria a 15 dpi. La cuantificación de las células CD11b⁺ y CD115⁺ a 15 y 25 dpi muestra que la densidad de células CD11b⁺ (A) y CD115⁺ (B) totales en el área desmielinizada es máxima a 15 dpi y se reduce significativamente a 25 dpi. El porcentaje de células CD11b⁺ y CD115⁺ que presentan inmunomarcaje para Arg-I no sufre variaciones respecto al total de células CD11b⁺ y CD115⁺ en los dos periodos en los que dichas células están presentes (C,D). Para los grupos analizados se ha realizado el test de la *t* de Student con valor de *p* significativo de ****p*<0,001.

Para corroborar si las células Arg-I tenían características de neutrófilos, se realizó el inmunomarcaje con el marcador de superficie específico de este tipo celular, Ly6B.2 (Wu et al., 2010), en la médula espinal de los ratones con EAE a 15 y 25 dpi. Dicho marcador no mostró colocalización con Arg-I, lo que nos permitió identificar dos subpoblaciones de células diferentes, según su fenotipo: las células Arg-I⁺/Ly6B.2⁻ y las células Arg-I⁻/Ly6B.2⁺. Las células Arg-I⁺/Ly6B.2⁻ se consideraron como MDSCs de la línea monocítica altamente supresoras, ya que expresaban los marcadores típicos de MDSCs (CD11, Gr-1 y CD115) y también por sus características morfológicas. Las células Arg-I⁻/Ly6B.2⁺ se identificaron como neutrófilos, con una morfología redondeada y el núcleo polilobulado típico de este grupo de granulocitos. Los

neutrófilos estaban circunscritos, exclusivamente, al área desmielinizada, como las MDSCs, aunque eran menos numerosos que las MDSCs (Fig. 22A-F).

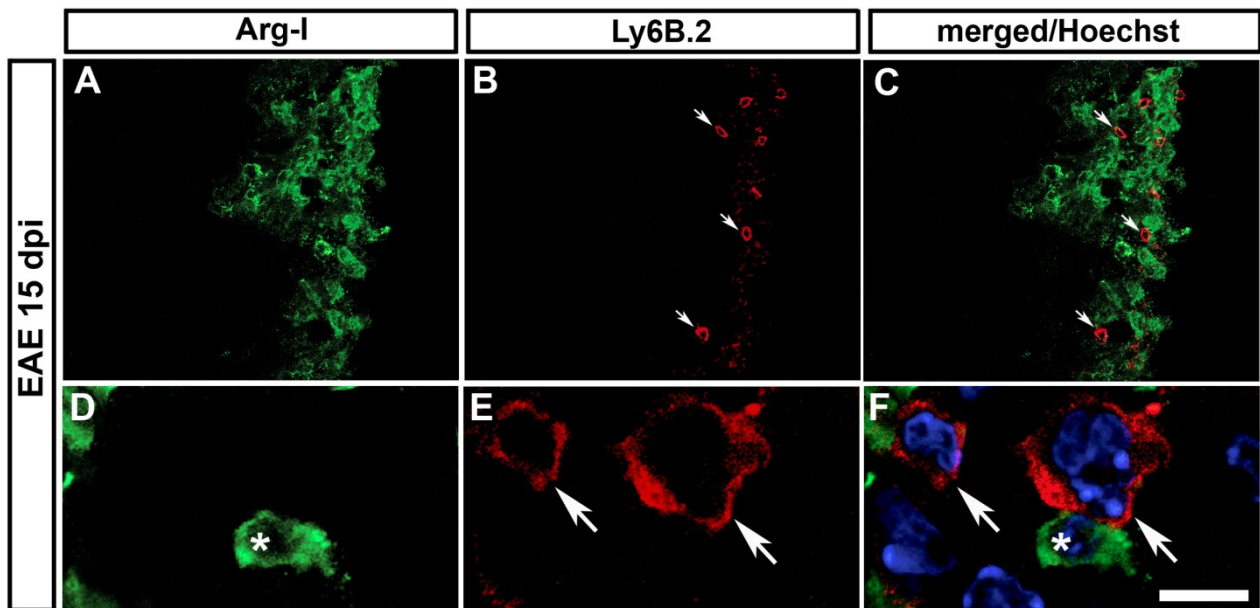


Figura 22: Las MDSCs-Arg-1⁺ no expresan el marcador de neutrófilos, Ly6B.2. El detalle de una zona desmielinizada a 15 dpi (escala clínica 3,5) muestra dos poblaciones celulares diferentes: MDSC-Arg-1⁺ (A) y neutrófilos (flechas en B-C), ambas poblaciones celulares localizadas exclusivamente en el interior del área desmielinizada. D-F: Células MDSC-Arg-1⁺ y Arg-1⁻/Ly6B.2⁺ en detalle, donde se observa que no hay colocalización entre ambos marcadores. La célula Arg-1⁻/Ly6B.2⁺ presenta la morfología típica de un neutrófilo con su característico núcleo polilobulado. La barra de escala representa 60 μ m en A-C y 9 μ m en D-F.

Expresión de iNOS en las Células Supresoras Derivadas de Mieloides

La capacidad inmunosupresora de las MDSC está asociada, no sólo a la expresión de Arg-1, sino también a la expresión de iNOS (Talmadge, 2007; Gabrilovich y Nagaraj, 2009). Para estudiar la expresión de la enzima iNOS en las MDSC-Arg-1⁺, se realizó inmunofluorescencia para Arg-1 y el marcador iNOS en las médulas espinales de los ratones con EAE a 15 y 25 dpi.

El análisis del tejido mostró inmunomarcaje para iNOS en ambos periodos experimentales en los que las células Arg-1⁺ estaban presentes y con un patrón de distribución espacio-temporal similar al observado para las células Arg-1⁺: muy abundantes a 15 dpi y escasas a 25 dpi (Fig. 23A-H).

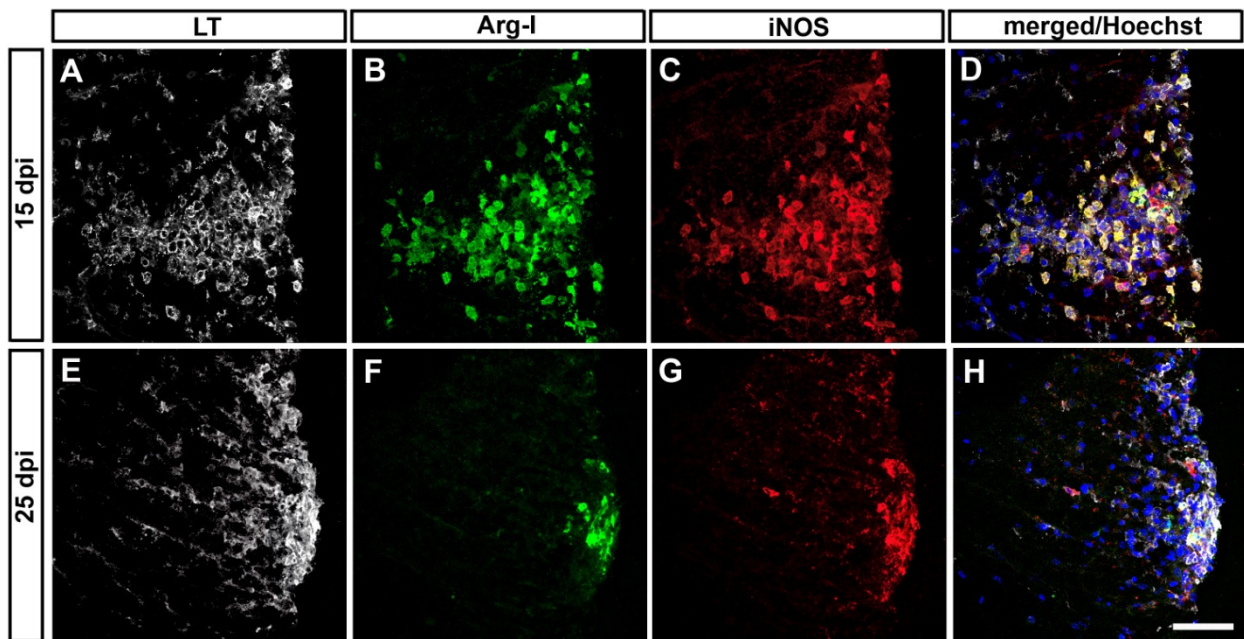


Figura 23: Las células Arg-I⁺ presentes en las médulas espinales de los ratones con EAE expresan, en su gran mayoría, iNOS. La expresión de iNOS presenta la misma distribución espacio-temporal que Arg-I: abundantes a 15 dpi (A-D) y escasas a 25 dpi (E-H). La barra de escala representa 50 μ m en A-H.

El análisis poblacional de ambos marcadores nos permitió distinguir 3 poblaciones celulares diferentes dentro del área infiltrada: células Arg-I⁺/iNOS⁺, células Arg-I⁺/iNOS⁻ y células iNOS⁺/Arg-I⁻ (Fig. 24A-D). El análisis cuantitativo de dichas poblaciones celulares a 15 y 25 dpi mostró que la población celular mayoritaria presente en ambos periodos tenía el fenotipo Arg-I⁺/iNOS⁺ y, en menor cantidad, aparecían los otros 2 tipos celulares: Arg-I⁺/iNOS⁻ o Arg-I⁻/iNOS⁺ (Fig. 24E). Comparativamente, la densidad de las células Arg-I⁺/iNOS⁺ fue significativamente mayor a 15 que a 25 dpi, mientras que el número de células Arg-I⁺/iNOS⁻ y Arg-I⁻/iNOS⁺ no sufrió variaciones significativas entre los dos periodos estudiados (Fig. 24E). Así en ambos periodos, el porcentaje de las células con el fenotipo Arg-I⁺/iNOS⁺ fue mucho mayor que el porcentaje de células Arg-I⁻/iNOS⁺, tanto respecto al total de células Arg-I como al total de células iNOS. Además, no se apreciaron diferencias significativas en el porcentaje de ambas poblaciones celulares entre ambos periodos estudiados. Por tanto, concluimos que la población celular mayoritaria a 15 y 25 dpi corresponde a la población de las células Arg-I⁺/iNOS⁺ (Fig. 24F).

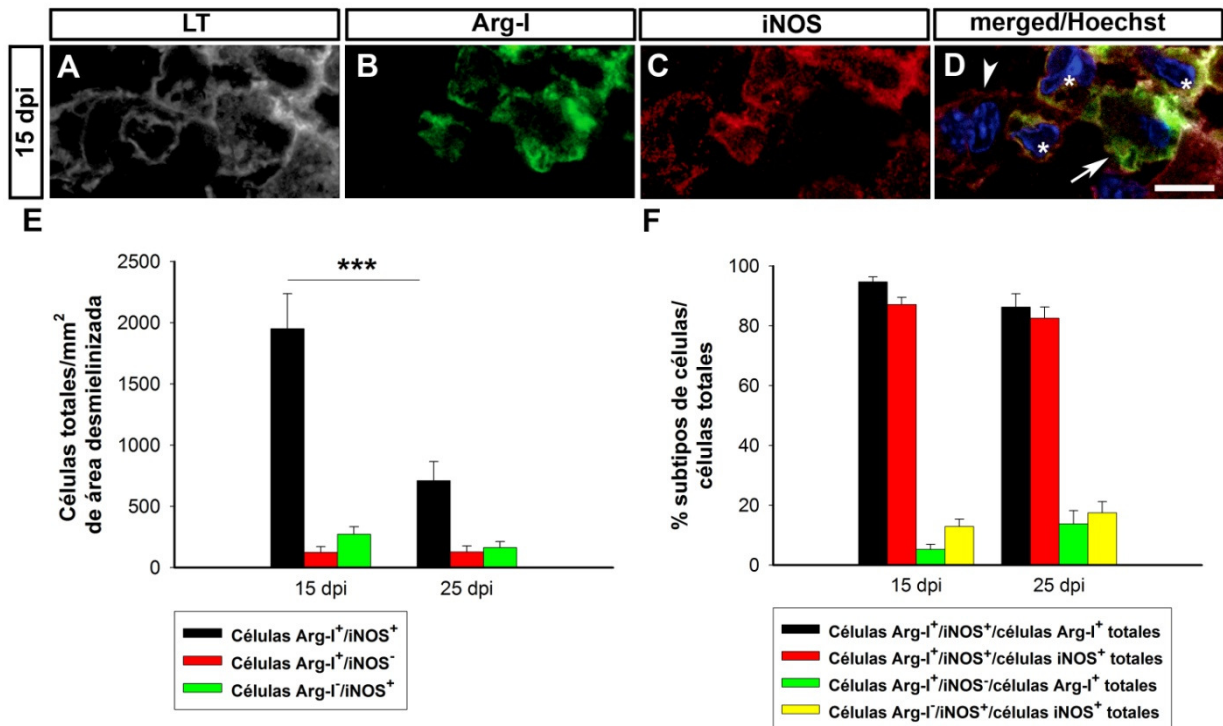


Figura 24: Poblaciones celulares de iNOS presentes en la médula espinal de los ratones con EAE. A-D: Detalle de las diferentes subpoblaciones celulares: Arg-I⁺/iNOS⁺ (asteriscos), Arg-I⁺/iNOS⁻ (flecha) y Arg-I⁻/iNOS⁺ (cabeza de flecha). El análisis cuantitativo muestra que las células Arg-I⁺/iNOS⁺ son las más abundantes tanto a 15 como a 25 dpi, presentando una densidad significativamente mayor a 15 dpi. Sin embargo, no existen variaciones significativas para las células Arg-I⁺/iNOS⁻ y Arg-I⁻/iNOS⁺ (E). El porcentaje de células de todos los subtipos respecto al total de células Arg-I⁺ o iNOS⁺ no sufre variaciones entre ambos periodos en los que están presentes (F). Para los grupos analizados se ha realizado el test de la *t* de Student con valor de *p* significativo de ****p*<0,001. La barra de escala representa 6 μm en A-D.

La presencia de las células Arginasa-I⁺ está asociada con la apoptosis de los linfocitos T

Las MDSCs ejercen su función inmunomoduladora sobre la población de linfocitos T de dos formas: reduciendo su capacidad de proliferación e induciendo su apoptosis (Bronte y Zanovello, 2005). Para que esta última tenga lugar, es imprescindible el contacto celular directo entre ambos tipos celulares (Apolloni et al., 2000; Slaney et al., 2011).

Para estudiar el posible efecto de las MDSCs sobre la proliferación de los linfocitos T *in vivo* realizamos un inmunomarcaje con Arg-I, CD4 o CD8 y fosfohistona 3 (PH3) en los dos periodos experimentales en los cuales las células Arg-I⁺ estaban presentes (15 y 25 dpi). El análisis del tejido mostró escasos núcleos marcados con PH3, tanto a 15, como a 25 dpi, y siempre localizados fuera del área infiltrada desmielinizada. En estos periodos no se observó que las MDSCs-Arg-I⁺ o los linfocitos T (CD4 o CD8) presentaran marcaje para PH3 (Fig. 25A-P).

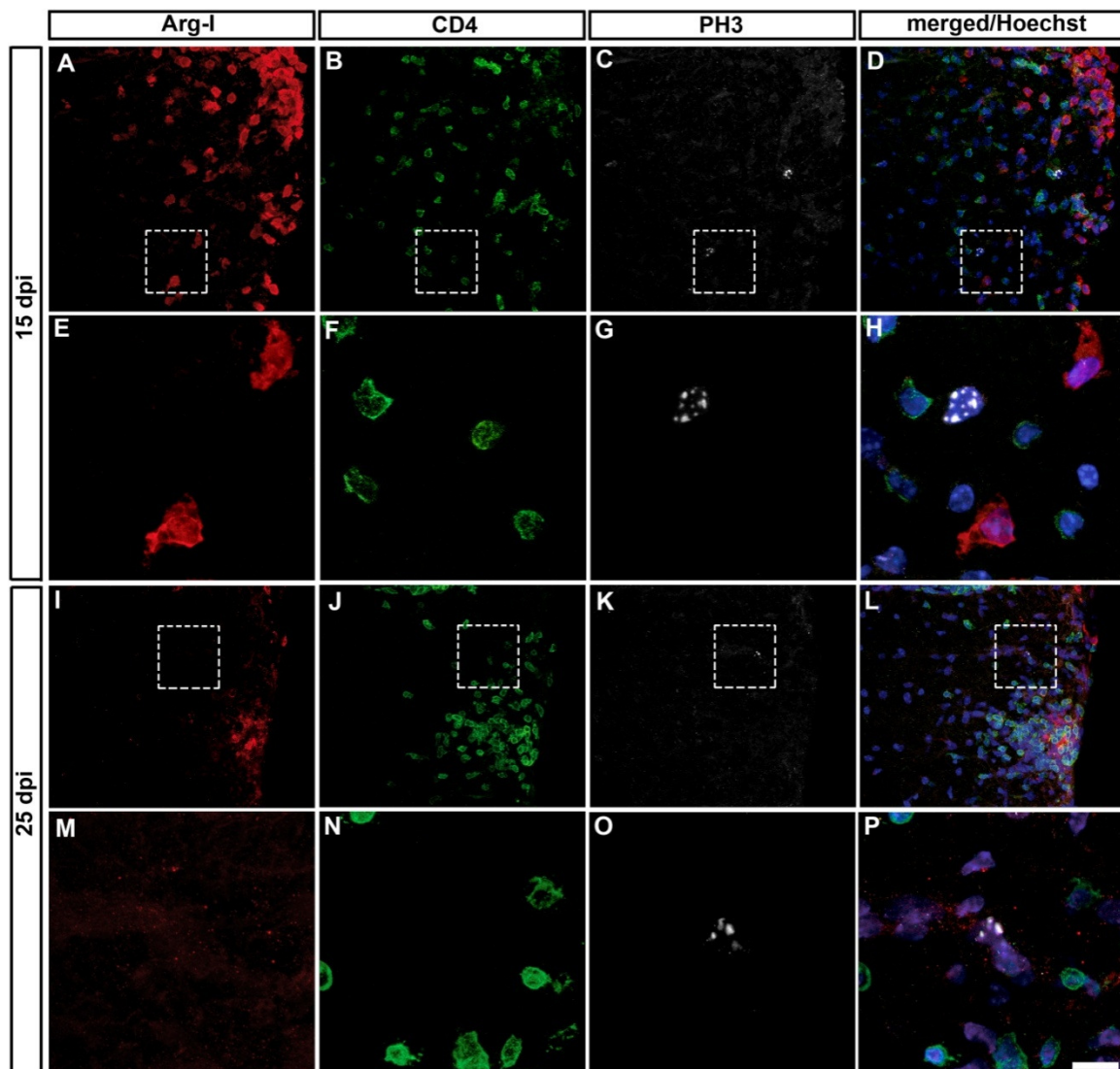


Figura 25: La presencia de MDSCs no influye en la proliferación de los linfocitos T durante la EAE.

Los núcleos inmunomarcados con PH3 están localizados fuera del área de lesión (enmarcado en A-D y I-L). El detalle de la zona enmarcada muestra que las MDSC-Arg-I⁺ y los linfocitos T CD4⁺ no presentan inmunomarcaje para fosfohistona 3 (PH3) ni a 15 (A-H) ni a 25 dpi (I-P). La barra de escala representa 40 μ m en A-D, 10 μ m en E-H, 40 μ m en I-L y 10 μ m en M-P.

Para establecer una relación entre las MDSCs y la apoptosis de los linfocitos T *in vivo*, combinamos la tinción de TUNEL junto con el marcaje de Arg-I y CD4 o CD8. Además, se realizó el estudio de la distribución espacial entre las MDSCs y los linfocitos T apoptóticos, midiendo la distancia entre ambos tipos celulares y establecimos las siguientes tres categorías de relación intercelular: células en contacto directo, células separadas menos de 5 μm , células separadas más de 5 μm (Tabla 6; Fig. 26A-H). A 15 dpi, el 73,4% de los linfocitos T CD4⁺ apoptóticos estaban directamente en contacto con las MDSCs-Arg-I⁺, el 25,4% en su proximidad (a menos de 5 μm), y tan sólo el 1,2% estaban a más de 5 μm de las MDSCs-Arg-I⁺. A 25 dpi, el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ apoptóticos en contacto directo con MDSCs-Arg-I⁺ disminuyó a un 26,4%, se mantuvo en el grupo que estaba en su cercanía (29,4%) y aumentó para los que aparecieron entre los alejados de las MDSCs (44,2%; Tabla 6).

En el caso de los linfocitos T CD8⁺ apoptóticos, también aparecieron en estrecha relación con las MDSCs en ambos periodos experimentales estudiados: a 15 dpi, se encontraron en contacto con las MDSC en un 68,75% de los casos, porcentaje menor que el observado para los linfocitos T CD4⁺; en un 31,25 % de los casos estaban a menos de 5 μm de distancia y en ningún caso se observaron lejos de las MDSCs (Tabla 6). A 25 dpi, el 100% de linfocitos T CD8⁺ apoptóticos aparecieron en contacto directo con las MDSC-Arg-I⁺. Resulta por tanto evidente, que la distribución espacial de los linfocitos T apoptóticos está estrechamente relacionada con la presencia de las MDSCs-Arg-I⁺, estando ambas células mayoritariamente en contacto directo (Tabla 6; Fig. 26A-H).

Tabla 6: Porcentaje y localización de linfocitos T apoptóticos junto a células Arg-I⁺

dpi	% Linfocitos T CD4 apoptóticos			% Linfocitos T CD8 apoptóticos		
	En contacto	< 5 μm	\geq 5 μm	En contacto	< 5 μm	\geq 5 μm
15	73,4	25,4	1,2	68,75	31,25	0
25	26,4	29,4	44,2	100	0	0

dpi = días postinmunización

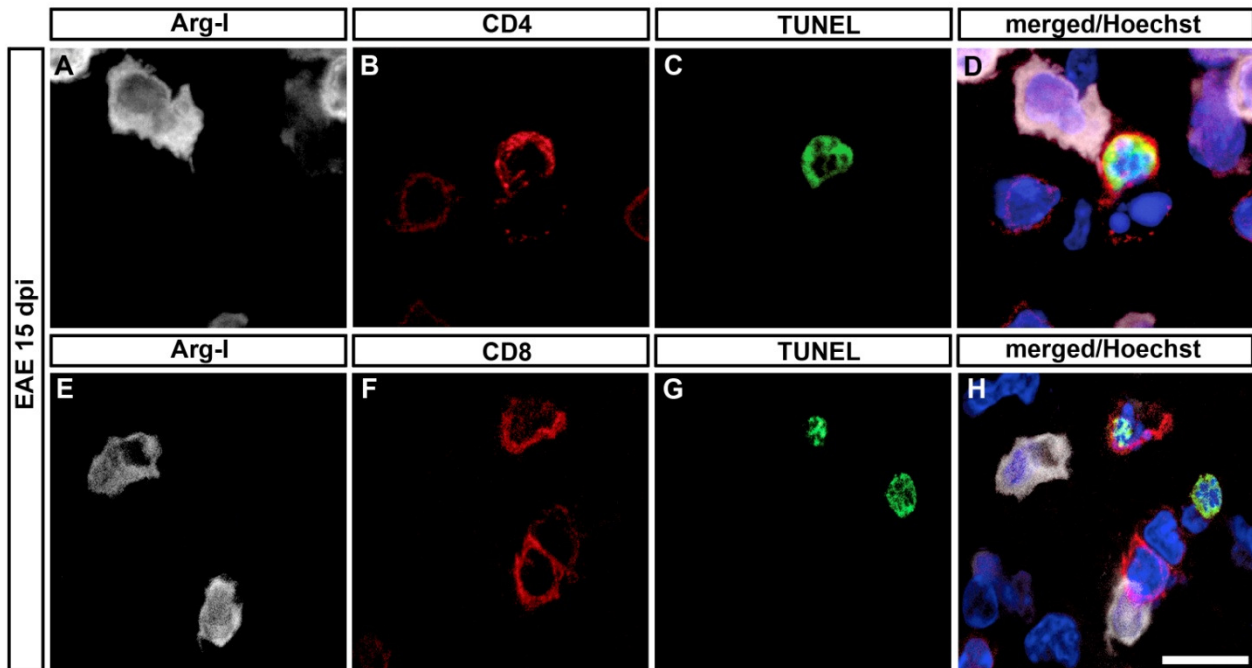


Figura 26: Distribución espacial de los linfocitos T apoptóticos y de las MDSCs-Arg-I⁺. Ejemplo de MDSC-Arg-I⁺ directamente en contacto con un linfocito T CD4⁺ apoptótico (A-D) y en las proximidades de un linfocito T CD8⁺ apoptótico (E-H) dentro de la zona de desmielinización a 15 dpi (escala clínica: 3). La barra de escala representa 10 μ m en A-D y 9 μ m en E-H.

La densidad total de linfocitos T CD4⁺ en el área desmielinizada fue la misma en los dos periodos estudiados (15 y 25 dpi; Fig. 27A). Sin embargo, la densidad de linfocitos T CD4⁺ apoptóticos fue significativamente mayor (Fig. 27B) al igual que su porcentaje (Fig. 27C) a 15 que a 25 dpi, en paralelo a lo observado con la densidad de MDSC-Arg-I⁺ (Fig. 13K). En el caso de los linfocitos T CD8⁺ tanto el número total de éstos como el de linfocitos T CD8⁺ apoptóticos fue significativamente menor a 15 que a 25 dpi (Fig. 27D-E). En cambio, el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ apoptóticos frente al número total de linfocitos T CD8⁺ fue significativamente mayor a 15 que a 25 dpi (Fig. 27F), al igual que ocurría con los linfocitos T CD4⁺ (Fig. 27C) y la densidad de MDSCs (Fig. 13K).

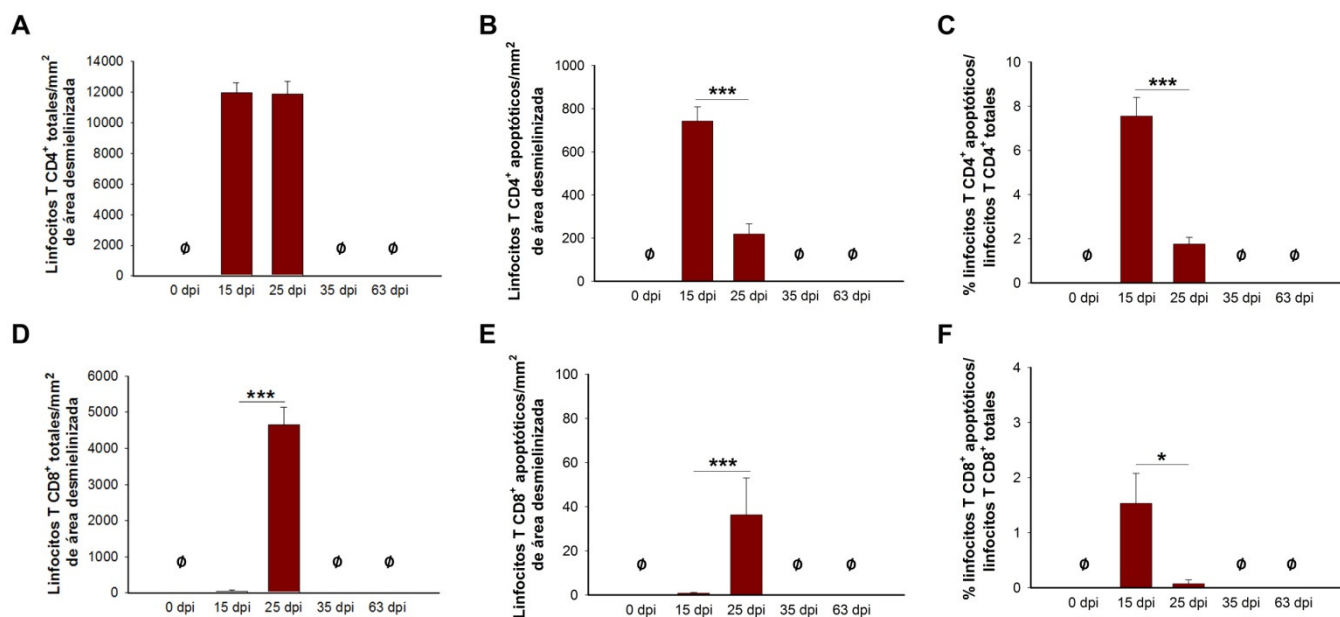


Figura 27: El patrón de expresión de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ apoptóticos es paralelo al observado en las células Arg-I⁺ durante la EAE. La densidad de los linfocitos T CD4⁺ en el área desmielinizada es la misma en ambos periodos (A). Sin embargo, la densidad de linfocitos T CD4⁺ apoptóticos (B) y el porcentaje que representan respecto al total de linfocitos T CD4⁺ es significativamente mayor a 15 que a 25 dpi (C). La densidad de los linfocitos T CD8⁺ totales es significativamente mayor a 25 que a 15 dpi (D), la densidad (E) y el porcentaje (F) de linfocitos T CD8⁺ es significativamente mayor a 15 que a 25 dpi. Ø: No se observaron células. Para el análisis entre los periodos 15 y 25 dpi realizamos el test de la *t* de Student con un valor de *p* significativo de **p*<0,05 y ****p*<0,001.

Además, a 15 dpi, se observó una correlación directa y altamente significativa entre la densidad de linfocitos T CD4⁺ apoptóticos y la de células Arg-I⁺ en el área desmielinizada, correlación que a 25 dpi no se observó (Fig. 28A-B). Sin embargo a 25 dpi, observamos una correlación inversa entre el número de linfocitos T CD8⁺ apoptóticos y la densidad de células Arg-I⁺ ($r=-0,383$; $p=0,03$), mientras que a 15 dpi no se halló correlación alguna entre ambas poblaciones celulares ($r=-0,114$; $p=0,431$).

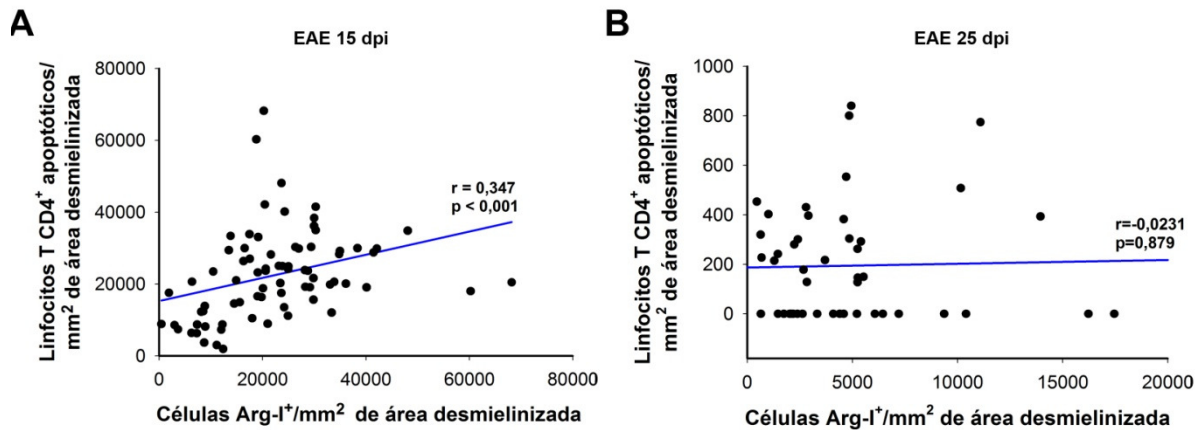


Figura 28: La presencia de MDSC- Arg-1⁺ se correlaciona con la densidad de linfocitos T apoptóticos en la médula espinal de los ratones EAE en el periodo final de incremento de los síntomas clínicos. El test de correlación de Pearson entre la densidad de células Arg-1⁺ y la de linfocitos T CD4⁺ apoptóticos muestra que existe una correlación directa y significativa entre ambas poblaciones de células a 15 dpi (A) que no se aprecia a 25 dpi (B). Para los dos grupos de ratones analizados se ha realizado el test de correlación de Pearson con valor de p significativo de $***p < 0.001$.

Además del estudio morfológico, analizamos por citometría de flujo las poblaciones celulares de la médula espinal de los ratones *sham* y EAE a 15 dpi. Se identificaron dos poblaciones celulares diferentes: linfocitos T CD3⁺ y células CD11b⁺/CD3⁻ (células mieloides, microglía residente/macrófagos infiltrados). En estas últimas distinguimos dos subpoblaciones celulares atendiendo a las dos subunidades del receptor Gr-1, Ly-6C y Ly-6G: CD11b⁺/Ly-6C^{high}/Ly-6G^{-low} y CD11b⁺/Ly-6C^{high}/Ly-6C^{int}, lo que nos permitió separar a las MDSCs monocíticas de los neutrófilos inmaduros, tal y como han realizado previamente otros grupos (Zhu et al., 2007). Comparando los ratones *sham* y EAE, observamos en estos últimos un incremento significativo del porcentaje de linfocitos T CD3⁺ y de las células CD11b⁺ totales respecto al total de células de la médula espinal. Además, se observó un aumento significativo del porcentaje de células CD11b⁺/Ly-6C^{high}/Ly-6G^{-low} y CD11b⁺/Ly-6C^{high}/Ly-6C^{int} respecto al total de células de la médula espinal (Fig. 29A-B).

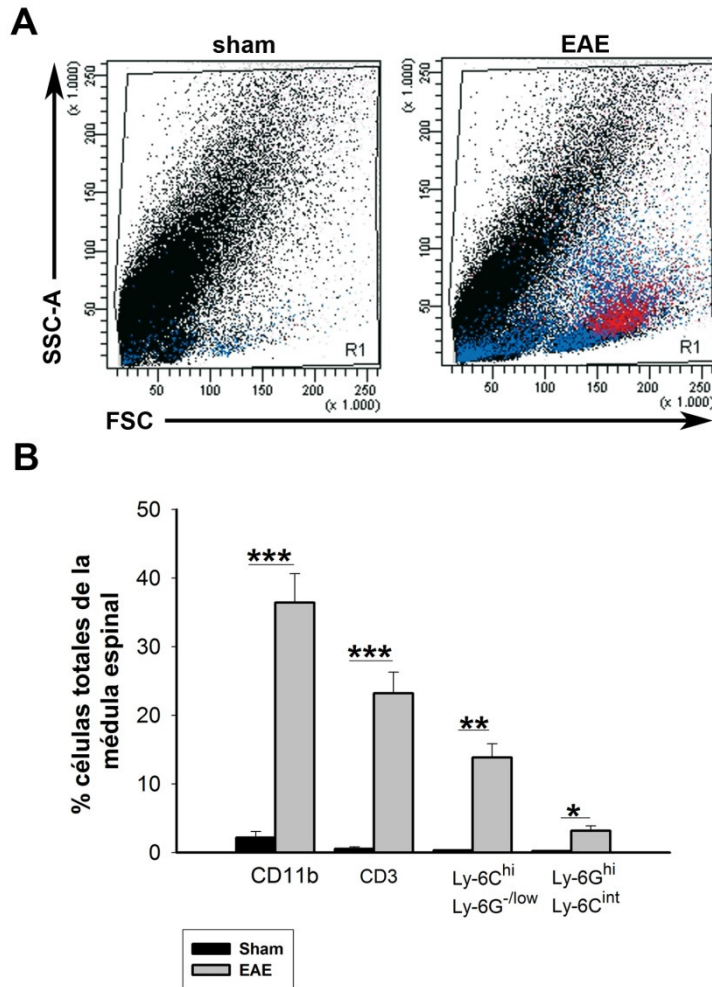


Figura 29: Análisis poblacional de los distintos tipos de células infiltradas en la médula espinal de los ratones EAE y *sham*. Los ratones EAE presentan un mayor porcentaje de células que apenas es observado en los ratones *sham* (eventos en azul en **A**). En el pico máximo de la escala clínica (15 dpi; valor medio de la escala clínica 3-3,5) el porcentaje de células CD11b⁺, CD3⁺, Ly-6C^{high}/Ly-6G^{-low} (MDSCs) y Ly-6C^{high}/Ly-6C^{int} (neutrófilos), con respecto al total de células infiltradas es significativamente mayor en los animales con EAE que en los *sham* (**B**). Para el análisis estadístico realizamos el test de la *t* de Student con un valor de *p* significativo de **p*<0,05, ***p*<0,01 y ****p*<0,001.

El porcentaje de células CD11b⁺/Ly-6C^{high}/Ly-6G^{-low} respecto al total de células CD11b⁺ también fue significativamente mayor en los animales con EAE que en los ratones *sham*. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células CD11b⁺/Ly-6C^{high}/Ly-6C^{int} respecto al total de células CD11b⁺ entre ambos grupos experimentales (Fig. 30A-B).

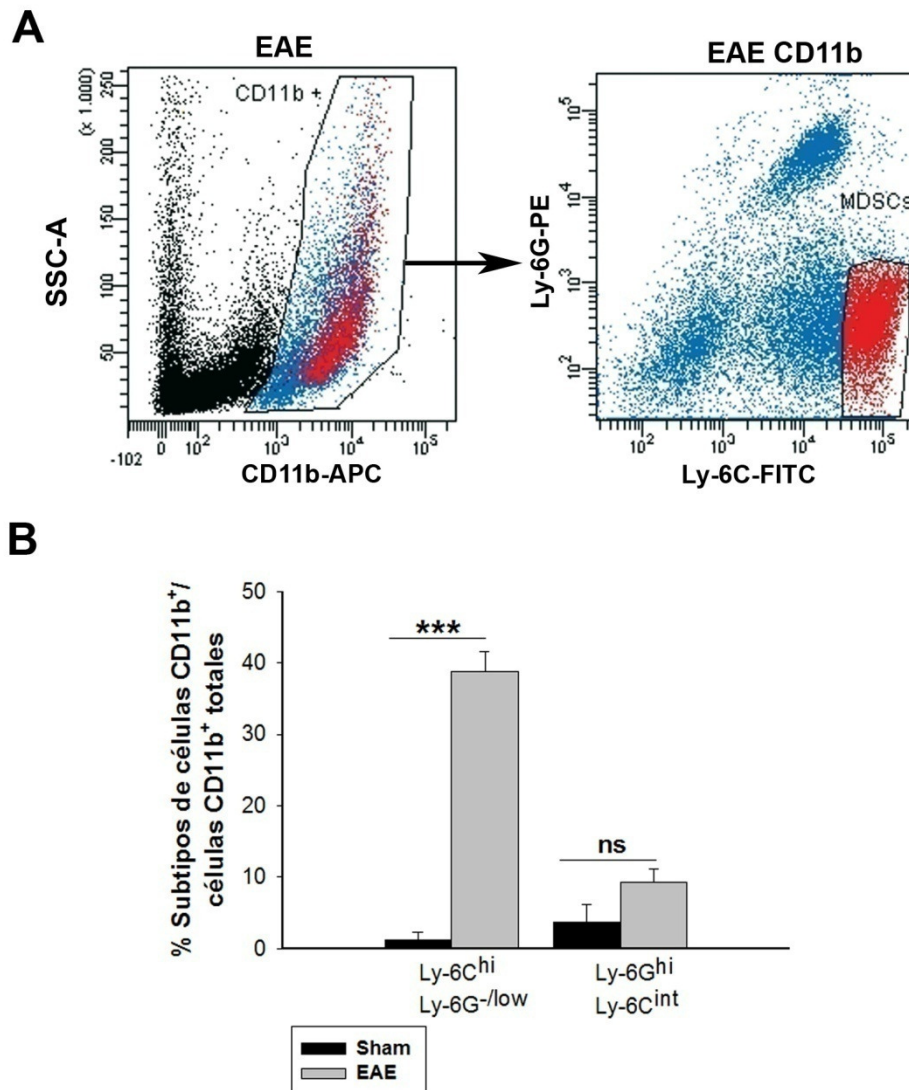


Figura 30: Las MDSCs son la subpoblación de células mieloides predominante al final del periodo de incremento de los síntomas clínicos de la EAE. Las MDSCs con fenotipo CD11b⁺/Ly-6C^{high}/Ly-6G^{-low} enmarcadas en rojo constituyen la subpoblación de células CD11b⁺ (representadas en azul) infiltradas en la médula espinal de los ratones EAE en el pico de máxima discapacidad (**A**). El porcentaje de las MDSCs (Ly-6C^{high}/Ly-6G^{-low}) con respecto al total de células CD11b⁺ fue significativamente mayor en la médula espinal de los animales con EAE que en los animales *sham*, mientras que no hubo diferencias significativas en los neutrófilos (Ly-6C^{high}/Ly-6C^{int}; **B**). Para el análisis estadístico realizamos el test de la *t* de Student con un valor de *p* significativo de ****p*<0,001, ns: no significativo *p*>0,05.

Los linfocitos T procedentes del bazo de ratones control estimulados o no con anti-CD3 y anti-CD28 durante 24 horas fueron expuestos a las MDSCs extraídas de los ratones con EAE al final del periodo de incremento de los síntomas clínicos (co-cultivo). Transcurridas 48 horas del co-cultivo, se analizó por citometría de flujo con el marcador de superficie CD3 y mediante la incorporación de Ioduro de Propidio el ciclo celular de los linfocitos T CD3⁺ estimulados y sin estimular. La presencia de MDSCs indujo un incremento

significativo de linfocitos T CD3⁺ activados muertos, que no observamos cuando co-cultivamos las MDSCs con los linfocitos T CD3⁺ no estimulados. Además, se detectó una disminución significativa en la proporción de linfocitos T CD3⁺ activados en fase SubG1 del ciclo celular respecto al total de linfocitos T CD3⁺ sin estimular. Sin embargo, los linfocitos T CD3⁺ estimulados en presencia de las MDSCs no presentaron variaciones significativas en las fases del ciclo celular G0-G1 (fases de reposo-proliferación) o S-G2-M (fases de síntesis-mitosis; Fig. 31). Estos experimentos *in vitro* confirmaron que las MDSCs procedentes de la médula espinal de los ratones con EAE justo al final del periodo de incremento de los síntomas clínicos tienen la capacidad de inmunosuprimir la respuesta inmune mediante la apoptosis de los linfocitos T estimulados sin afectar a su proliferación.

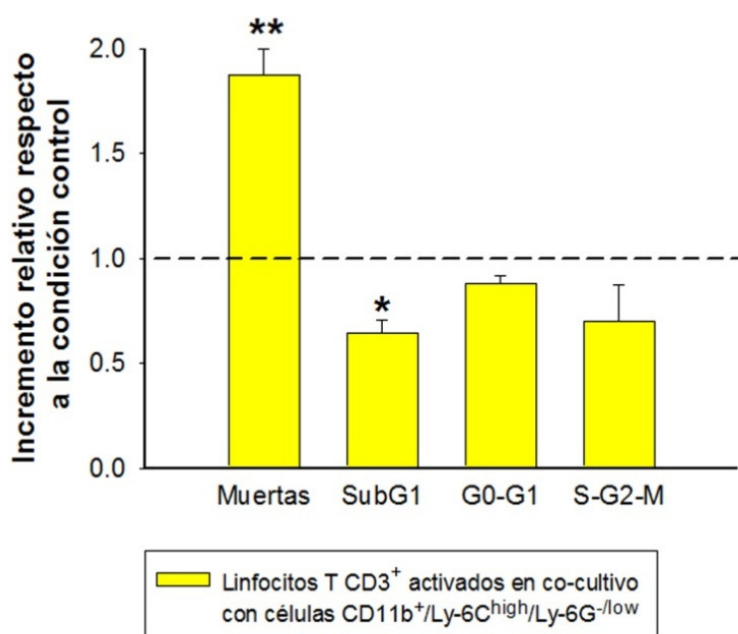


Figura 31: Las MDSCs procedentes de la médula espinal de ratones inmunizados aceleran la muerte de los linfocitos T activados. Las MDSCs extraídas de la médula espinal de ratones con EAE justo al final del periodo de incremento de los síntomas clínicos (escala clínica: 3-3,5) incrementan significativamente el porcentaje de linfocitos T activados muertos, producen una disminución significativa en el porcentaje de células T activadas en fase SubG1 y no producen variaciones significativas en la proporción de células T viables (G0-G1 o S-G2-M) respecto a la condición control (línea discontinua: linfocitos T no activados en co-cultivo con las MDSCs). Para el análisis estadístico realizamos un test de la *t* de Student con un valor de *p* significativo de **p*<0,05 y ***p*<0,01.

B. Modulación de la población de Células Supresoras Derivadas de Mieloides mediante el tratamiento con Am80

El tratamiento con Am80 impide la supresión de la respuesta autoinmune en el curso clínico de la EAE

Las MDSCs tienen diferentes funciones durante el curso clínico de la EAE: mientras que las MDSCs extraídas del SNC de ratones con EAE en el inicio del curso clínico funcionan como APCs, las MDSCs extraídas al final del periodo de incremento de los síntomas clínicos tienen exclusivamente funciones inmunosupresoras sobre la respuesta inflamatoria (Zhu et al., 2011). Por ello, decidimos estudiar los efectos moduladores del retinoide sintético Am80 sobre esta población celular. Para ello administramos Am80 a los ratones 4 días después del onset, cuando todos los ratones con EAE de ambos grupos alcanzaron una escala clínica mínima de 2. La administración se realizó durante 5 días, tiempo suficientemente largo para que el fármaco afecte a las MDSCs como indicó Kusmartsev et al (2003), y finalizó una vez ocurrida la inmunosupresión de la respuesta inmune (22dpi).

Tabla 7: Pesos y valores clínicos medios y acumulados durante el tratamiento con Am80. Los valores se indicaron con la media \pm error estándar de la media.

Periodo clínico	EAE-CMC			EAE-Am80		
	Peso medio (gr)	Valor clínico medio	Valor clínico acumulado	Peso medio (gr)	Valor clínico medio	Valor clínico acumulado
Comienzo de los síntomas clínicos (14 dpi)	19,26 \pm 0,42	0,33 \pm 0,16	1 \pm 0,66	18,16 \pm 0,44	0,16 \pm 0,16	0,68 \pm 0,66
Inicio de la administración de Am80 y el vehículo (17 dpi)	17,40 \pm 0,79	2,33 \pm 0,33	5,66 \pm 1,36	17,60 \pm 0,89	2,25 \pm 0,14	4,93 \pm 1,14
Final de la administración de Am80 y el vehículo (22 dpi)	17,53 \pm 1,26	2,04 \pm 0,35	15,82 \pm 2,92	16,22 \pm 1,41	2,92 \pm 0,46	19,89 \pm 2,06

Tanto los ratones *sham* como los ratones con EAE presentaron un incremento de peso desde el inicio de la inmunización. En el momento en el que aparecieron los primeros síntomas de discapacidad (14 dpi) los ratones con EAE empezaron a perder peso. Una vez

iniciado el tratamiento con Am80 o la administración del vehículo (17 dpi) y hasta el final del ensayo, los ratones *sham*-CMC y *sham*-Am80 no presentaron diferencias significativas de peso. En cambio, los ratones con EAE tratados con Am80 siguieron perdiendo peso en comparación a los ratones con EAE que recibieron el vehículo (Tabla 7; Fig. 32A).

Los primeros síntomas clínicos de EAE aparecieron para ambos grupos de ratones a 14 dpi y la administración de Am80 o el vehículo CMC comenzó a 17 dpi. Los valores clínicos medios y acumulados en ambos momentos fueron similares en ambos grupos experimentales (Tabla 7). Sin embargo, a 21 y 22 dpi el tratamiento con Am80 indujo en los ratones con EAE un incremento significativo del valor clínico medio y acumulado en comparación a los que se administró sólo el vehículo (Tabla 7). Por tanto, la administración de Am80 a 17dpi impidió la transición al periodo de recuperación sintomática observada en los ratones EAE-CMC (Tabla 7; Fig. 32B).

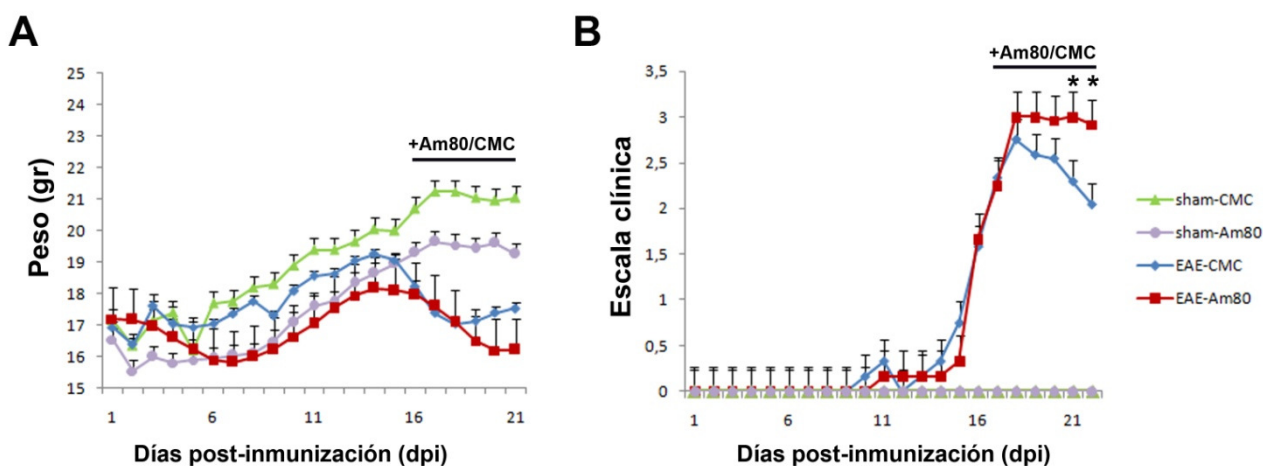


Figura 32: Evolución clínica de la EAE y progresión del peso durante la administración de Am80. La línea indica el periodo de la administración del vehículo (CMC) o del Am80. Únicamente se observan diferencias significativas en la escala clínica entre los grupos de ratones EAE-CMC y EAE-Am80 a 21 y 22 dpi (A). El tratamiento con Am80 no afecta significativamente al peso de los ratones *sham* respecto a los ratones *sham*-CMC. En cambio, en los ratones EAE a los que se ha administrado el fármaco pierden peso durante todo el tratamiento (B). Para el análisis estadístico realizamos en todos los grupos experimentales el test de la *t* de Student con un valor de *p* significativo de $*p < 0,05$.

Am80 induce un aumento en el porcentaje de linfocitos T en el bazo de los ratones con EAE

Mediante citometría de flujo, estudiamos las poblaciones de linfocitos T de los bazos de los ratones *sham* y EAE, tanto en los tratados con Am80 como a los que se administró su vehículo. El tratamiento con Am80 no provocó cambios significativos en el porcentaje de linfocitos T CD3⁺ respecto al total de esplenocitos en los ratones *sham* ni en los ratones con EAE comparado con los ratones vehículo (Fig. 33A-C).

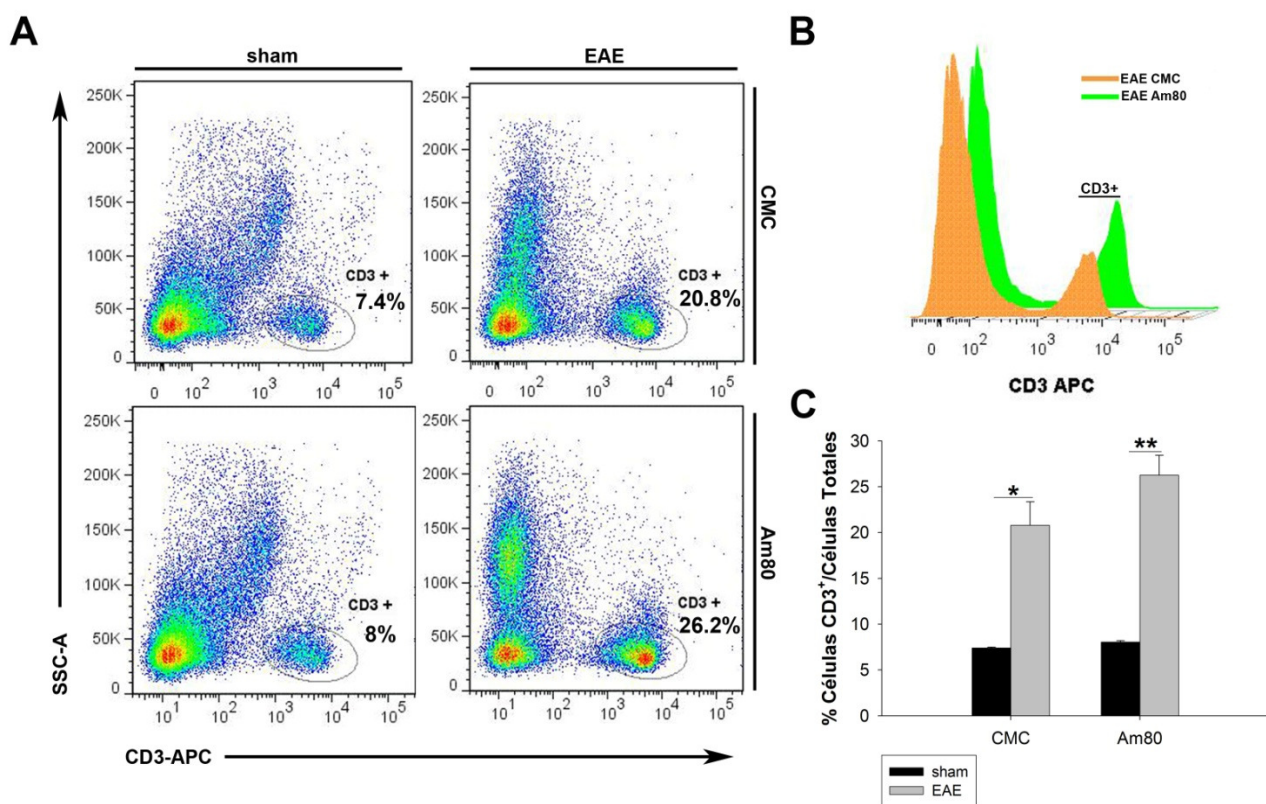


Figura 33: Am80 no induce cambios en el porcentaje de linfocitos T CD3⁺ en el bazo de los ratones con EAE. Ejemplo representativo bidimensional (dot plot) de un ratón de cada grupo experimental. El área enmarcada corresponde a la población de linfocitos T CD3⁺ analizada (A). Representación en un histograma tridimensional para ambos ratones con EAE, Am80 (en verde) y CMC (en naranja; B). El tratamiento con Am80 no produce cambios significativos en el porcentaje de estas células en los ratones con EAE en comparación a los ratones con EAE no tratados. Sin embargo, Am80 incrementa lo suficiente el porcentaje de linfocitos T CD3⁺ respecto al total de células en los ratones con EAE como para que las diferencias estadísticas sean mayores respecto a los ratones *sham* que en el grupo de ratones vehículo, EAE-CMC y *sham*-CMC (C). Para el análisis estadístico realizamos el test de la *t* de Student con un valor de *p* significativo de **p*<0,05 y ***p*<0,01.

Pese a no haber diferencias en el porcentaje de linfocitos T CD3⁺ respecto al total de esplenocitos entre ambos grupos de ratones con EAE, el tratamiento con Am80 indujo que se incrementaran las diferencias significativas entre los ratones EAE y *sham*. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos T CD3⁺ respecto al total de esplenocitos entre los ratones *sham*-CMC y *sham*-Am80 (Fig. 33A-C).

Am80 aumentó el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ respecto al total de esplenocitos y al total de linfocitos T CD3⁺ en los ratones con EAE frente a los ratones EAE-CMC (Fig. 34A-C; Fig. 36A-C).

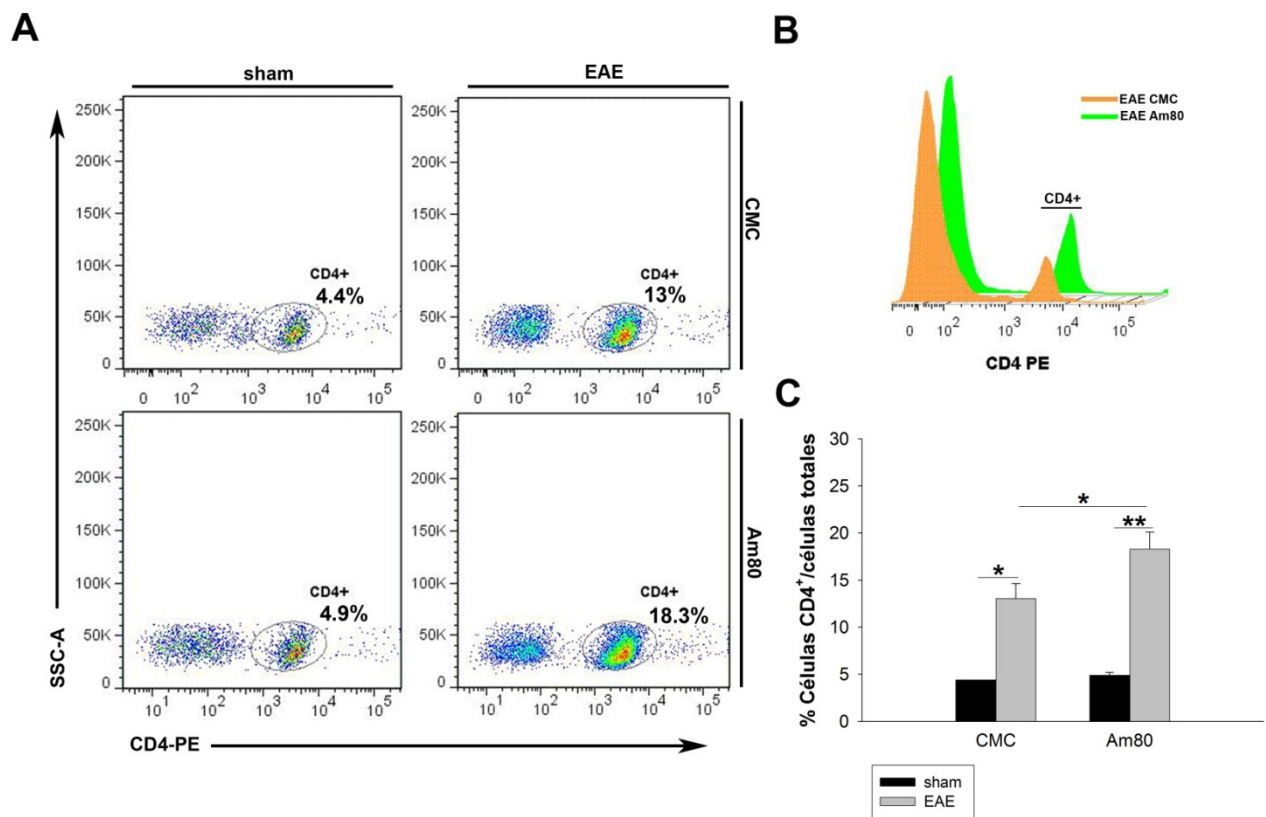


Figura 34: Am80 aumenta el porcentaje de los linfocitos T CD4⁺ respecto al total de esplenocitos en los ratones EAE. Ejemplo representativo bidimensional (Dot-Plot) de un ratón con EAE y un *sham* para cada grupo experiencial. El área enmarcada representa la población de células T CD4⁺ analizada (A). Histograma tridimensional para el ratón representativo EAE-Am80 (en verde) y el ratón EAE-CMC (histograma naranja; B). El análisis estadístico muestra el incremento en el porcentaje de estas células así como un aumento en las diferencias estadísticas entre los ratones con EAE y los *sham* tras el tratamiento con Am80 (C). Para el análisis estadístico realizamos el test de la *t* de Student con un valor de *p* significativo de **p*<0,05 y ***p*<0,01.

Además, Am80 incrementó la diferencia estadística de dichas células entre los ratones con EAE y *sham*. No se observaron cambios en el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ respecto al total de esplenocitos y respecto al total de CD3⁺ en los ratones *sham* tratados con Am80 y los ratones *sham* vehículo (Fig 34A-C y 36A-D).

El tratamiento con Am80 no provocó cambios significativos en el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ respecto al total de esplenocitos entre ambos grupos de ratones *sham* ni entre los ratones con EAE (Fig. 36A-C). En cambio, el fármaco indujo en los ratones con EAE un descenso significativo en el porcentaje de dichas células respecto al total de linfocitos T CD3⁺ en comparación al observado en los ratones con EAE-CMC (Fig. 36A-B,D), sin que se observaran variaciones en los ratones *sham*.

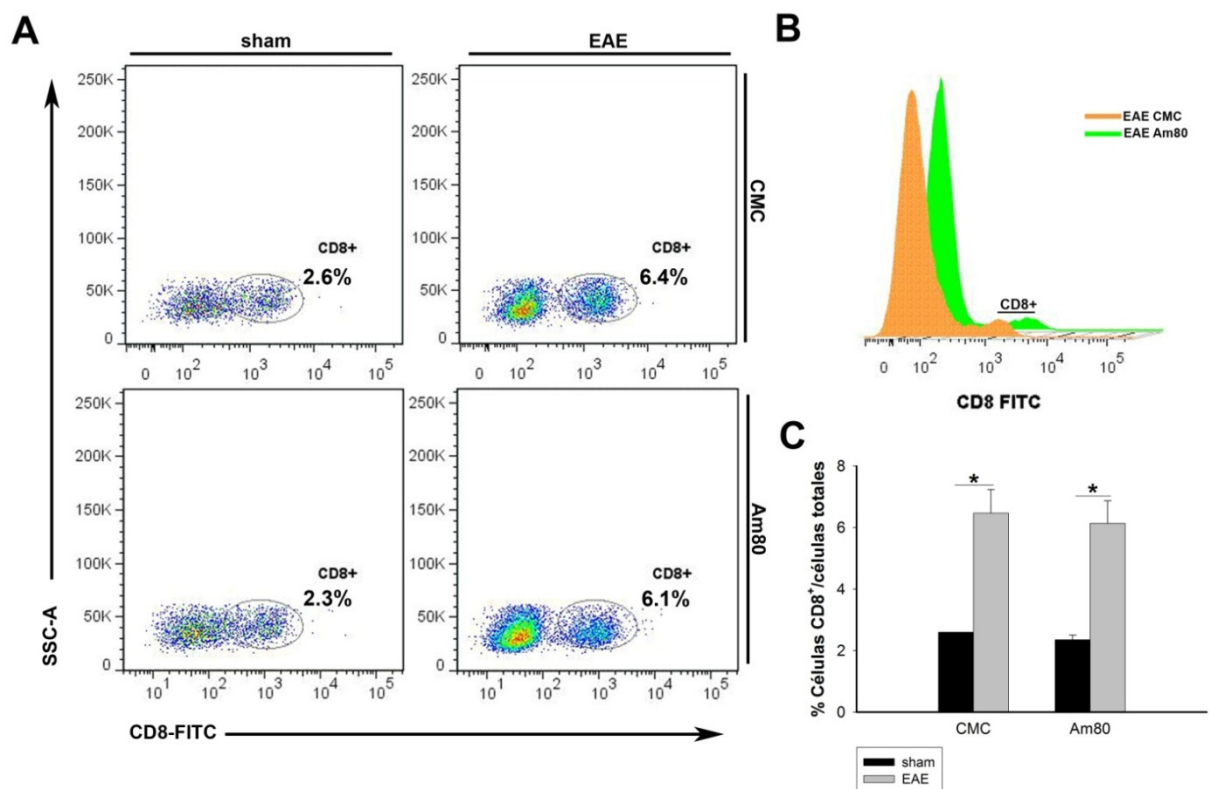


Figura 35: Am80 no afecta al porcentaje de linfocitos T CD8⁺ respecto al total de esplenocitos. Ejemplo representativo en dos dimensiones de citometría de flujo (Dot-Plot) para cada grupo experimental. La zona enmarcada representa la población de linfocitos T CD8⁺ analizada (A). Representación tridimensional en un histograma del porcentaje de linfocitos T CD8⁺ para el ratón representativo EAE-CMC (naranja) y EAE-Am80 (verde; B). Am80 no induce diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ respecto al total de esplenocitos entre los ratones EAE-Am80 y EAE-CMC, ni entre los ratones *sham* (C). Para el análisis estadístico realizamos el test de la *t* de Student con un valor de *p* significativo de **p*<0,05.

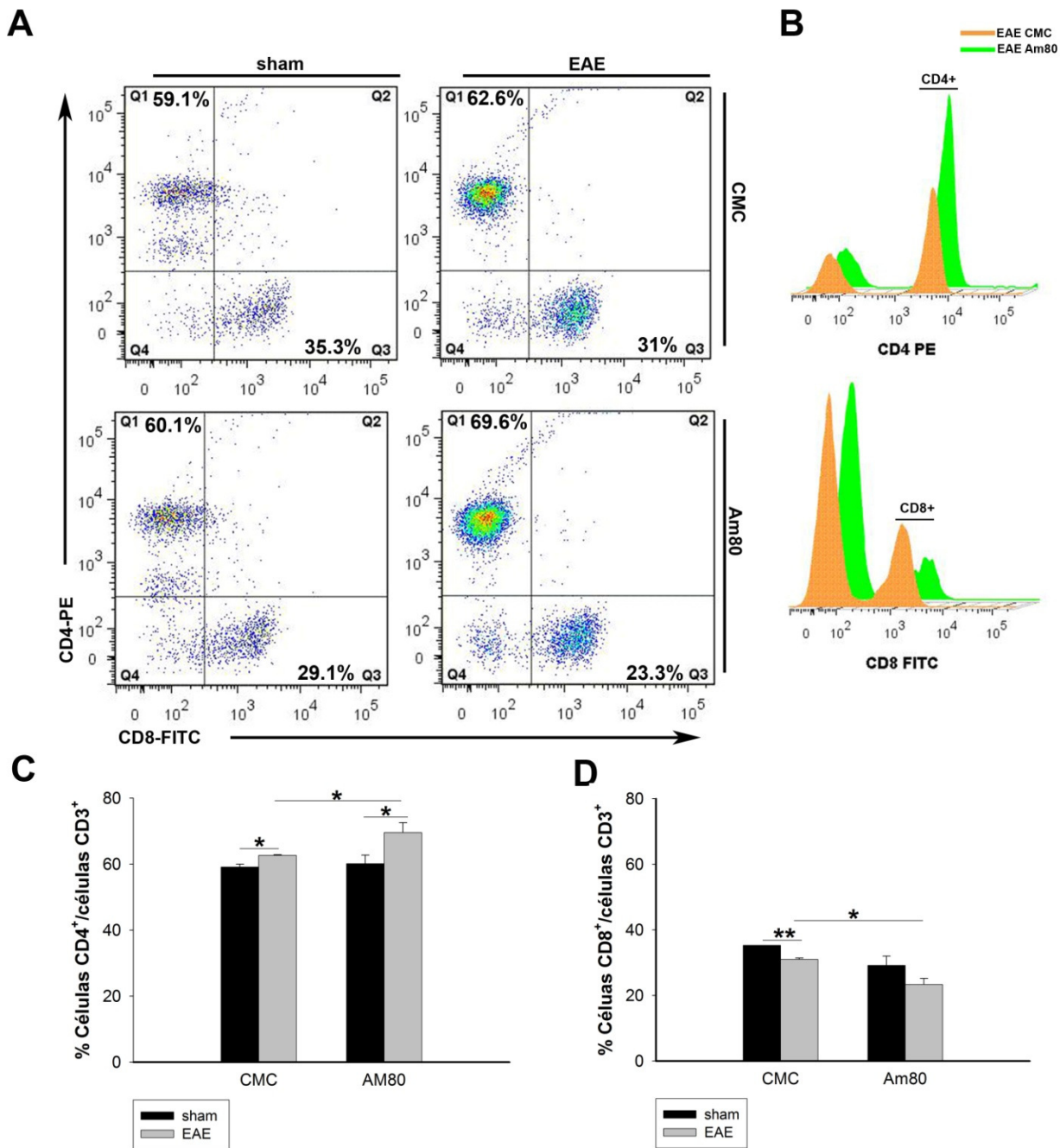


Figura 36: Am80 incrementa el ratio CD4/CD8 respecto al total de linfocitos T CD3⁺ en el bazo de los ratones con EAE. Ejemplo representativo bidimensional de citometría de flujo (Dot-Plot) de las subpoblaciones linfocitarias CD4 y CD8 respecto al conjunto de linfocitos T CD3⁺ (A). Representación tridimensional en un histograma del porcentaje de ambas subpoblaciones linfocitarias respecto al total de linfocitos T CD3⁺, tanto del ratón EAE representativo para el grupo CMC (naranja) como del ratón para el grupo Am80 (verde; B). Am80 induce un incremento significativo en el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ (C) y un descenso significativo en los linfocitos T CD8⁺ (D) respecto a los linfocitos T CD3⁺ totales en los ratones EAE tratados con el fármaco en comparación a los ratones con EAE vehículos. Los ratones sham tratados con Am80 no presentan diferencias significativas para ambas subpoblaciones celulares de linfocitos T respecto a los ratones sham vehículos (C,D). Para el análisis estadístico realizamos el test de la *t* de Student con un valor de *p* significativo de **p*<0,05 y ***p*<0,01.

Am80 induce la disminución de la población de Células Supresoras Derivadas de Mieloides y la acumulación de neutrófilos en el bazo de los ratones con EAE

Para realizar el análisis de las MDSCs y de los neutrófilos de los bazos de los ratones con EAE y los ratones *sham* (Am80 y CMC) se marcó con: CD11b, Ly-6C y Ly-6G, y se realizó el análisis mediante citometría de flujo de las células CD11b⁺ y de sus dos subpoblaciones, CD11b⁺/Ly-6C^{high}/Ly-6G^{low/-} (MDSCs) y CD11b⁺/Ly-6C^{int}/Ly-6G^{high} (neutrófilos). El tratamiento con Am80 no indujo cambios significativos en el porcentaje de células CD11b⁺ respecto al total de células de bazo entre los ratones con EAE ni entre los ratones *sham* (Fig. 37A-C). Sin embargo, el fármaco incrementó las diferencias estadísticamente significativas entre los ratones con EAE y los *sham*.

Por otro lado, Am80 no indujo variaciones estadísticamente significativas en el porcentaje de las MDSCs respecto al conjunto de esplenocitos ni entre los ratones *sham* ni entre los ratones con EAE (Fig. 37D). Sin embargo, sí provocó un incremento significativo en el porcentaje de neutrófilos respecto al total de células del bazo en los ratones con EAE. La variación fue de tal magnitud que el fármaco agudizó la diferencia estadística observada entre los ratones con EAE y los ratones *sham* en comparación a la observada en el grupo de los ratones vehículo (EAE-CMC y *sham*-CMC; Fig. 37E).

La administración de Am80 produjo en los ratones con EAE una disminución significativa en el porcentaje de MDSCs respecto del total de células mieloides, equiparándolo al de los animales *sham*-Am80 (Fig. 38A-B). Por el contrario, el fármaco provocó en estos ratones un incremento significativo en el porcentaje de neutrófilos respecto al total de células mieloides (Fig. 38A-C).

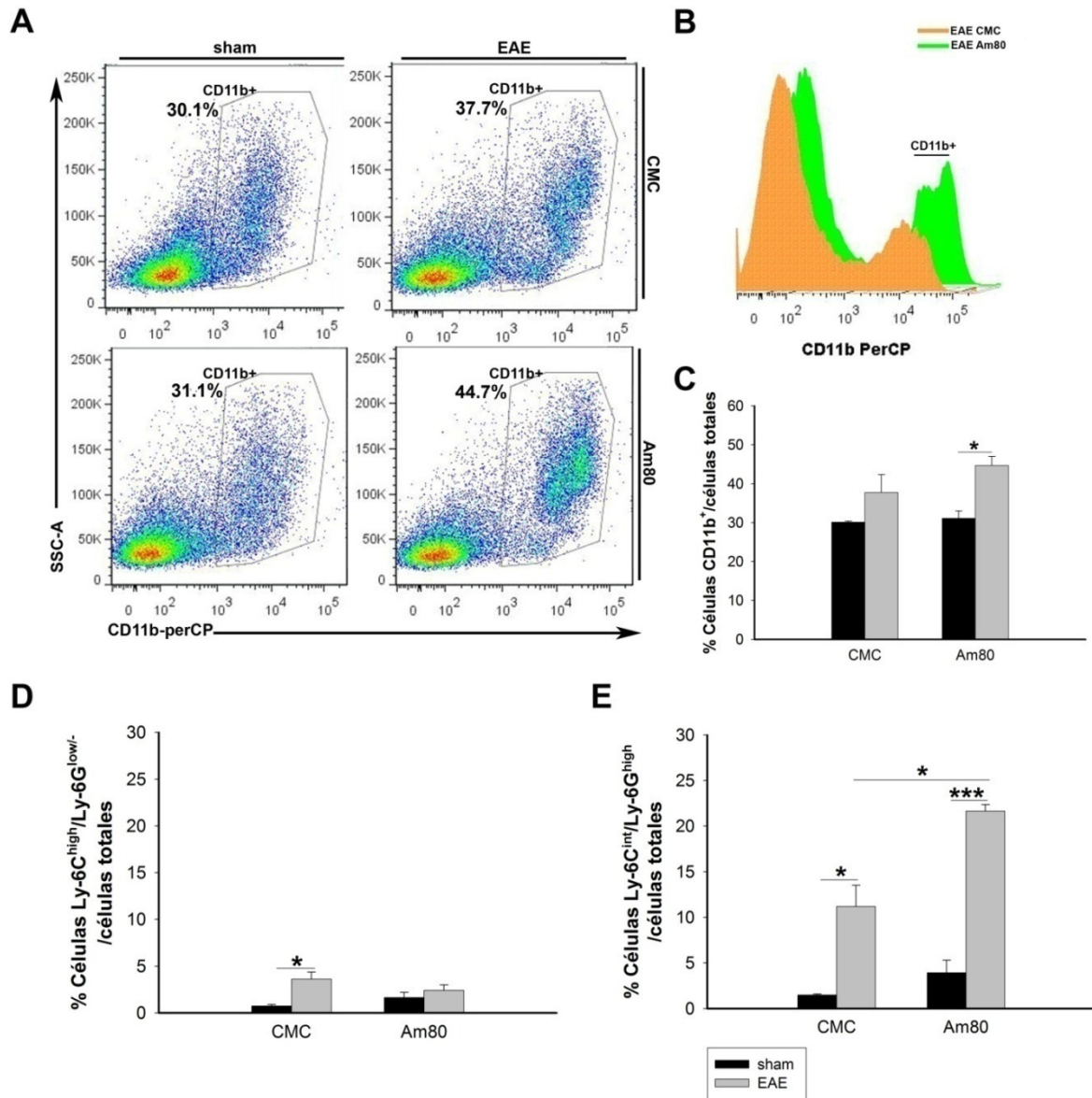


Figura 37: Am80 incrementa el porcentaje de neutrófilos respecto al total de esplenocitos en los ratones con EAE. Ejemplo representativo bidimensional de citometría de flujo (Dot-Plot) de la población celular mieloide respecto al conjunto de esplenocitos (**A**). Histograma tridimensional de un ratón representativo EAE (CMC en naranja y Am80 en verde; **B**). Am80 no induce diferencias significativas en el porcentaje de células mieloides en los ratones con EAE (**C**). El tratamiento disminuye el porcentaje de MDSCs respecto al total de esplenocitos, desapareciendo las diferencias estadísticas observadas entre los ratones con EAE y *sham* (**D**). Am80 incrementa significativamente el porcentaje de neutrófilos respecto al total de esplenocitos en los ratones con EAE frente a su vehículo y acentúa las diferencias estadísticas con los ratones *sham*-Am80 (**E**). Para el análisis estadístico realizamos el test de la *t* de Student con un valor de *p* significativo de **p*<0,05 y ****p*<0,001.

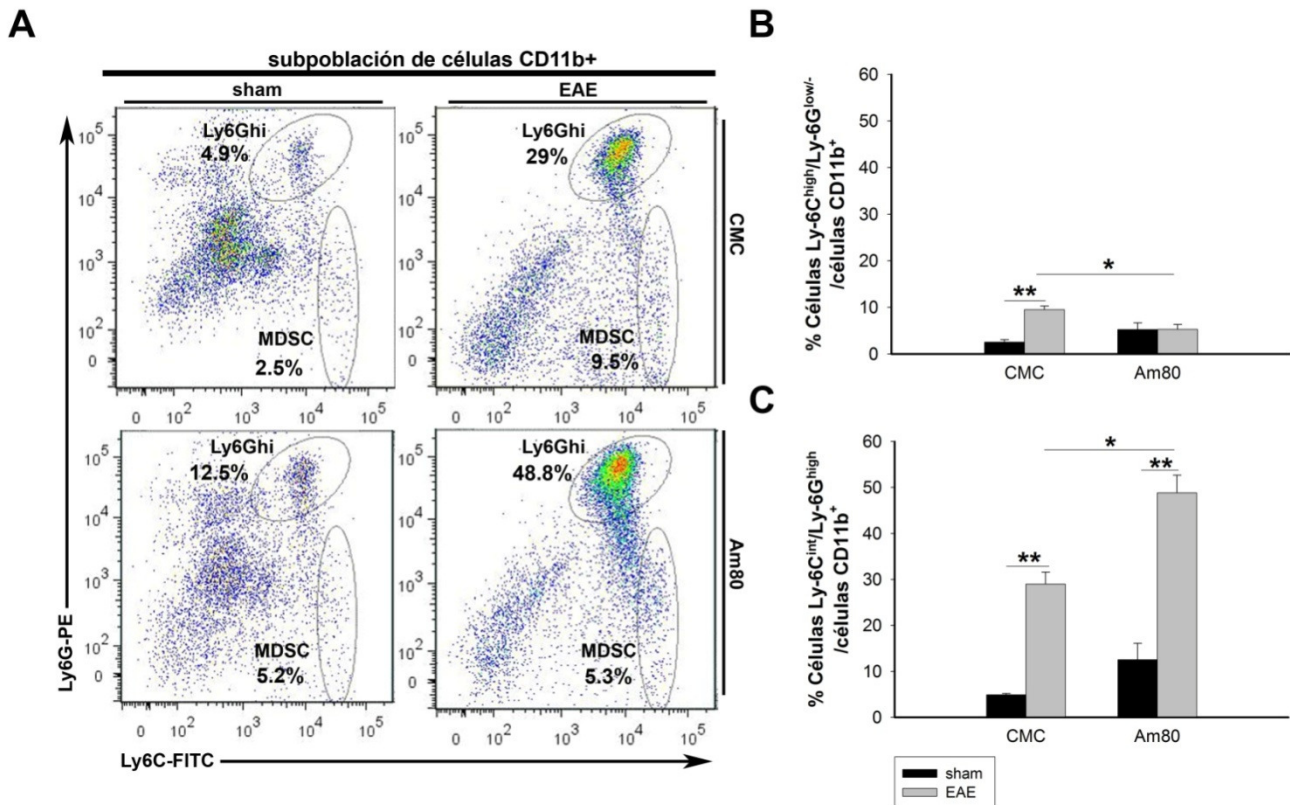


Figura 38: Am80 reduce el porcentaje de MDSCs e incrementa el porcentaje de neutrófilos respecto al total de células mieloides en los ratones EAE. Ejemplo representativo de citometría de flujo (Dot-Plot) de las dos subpoblaciones de células mieloides: CD11b⁺/Ly-6C^{high}/Ly-6G^{low}- (MDSC) y CD11b⁺/Ly-6C^{int}/Ly-6G^{high} (neutrófilos; **A**). Am80 disminuye significativamente el porcentaje de MDSCs respecto al total de células CD11b⁺ en los EAE, igualándola a la de los ratones sham-Am80 (**B**). Am80 incrementa significativamente el porcentaje de neutrófilos respecto el total de células CD11b⁺ en los ratones EAE (**C**). Para el análisis estadístico realizamos el test de la *t* de Student con un valor de *p* significativo de **p*<0,05 y ***p*<0,01.

Am80 incrementa la densidad de granulocitos infiltrados en la médula espinal de los ratones con EAE

El tratamiento con Am80 no produjo cambios en la población de células Arg-I⁺/Gr-1⁺ en la médula espinal de los ratones sham ya que en ningún caso los ratones sham mostraron la presencia de estas células en su médula espinal (Fig. 39A-H). En cambio, la médula espinal de los ratones EAE-Am80 mostró extensas áreas con células infiltradas localizadas en la sustancia blanca marcadas con LT (Fig. 40A,I) que, junto a la combinación de los marcadores Arg-I y Gr-1, permitió indentificar dos subpoblaciones celulares diferentes: las células Arg-I⁺ (que siempre expresaban el marcador Gr-1), y las células Arg-I⁻

/Gr-1⁺. Ambas poblaciones se localizaban, exclusivamente, en el área desmielinizada infiltrada, tanto en el grupo de animales EAE-CMC como en los tratados con Am80 (Fig. 40A-D, I-L).

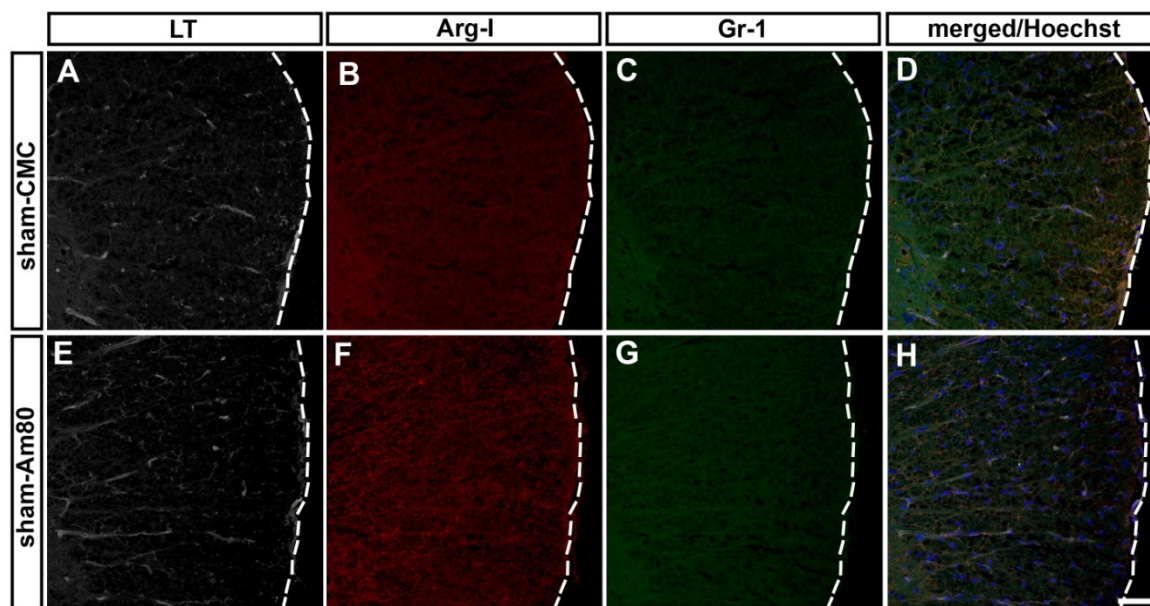


Figura 39: Am80 no induce cambios en la expresión de Arg-I y Gr-1 en la médula espinal de los animales *sham*. Microfotografías de una zona parcial de la médula espinal de un animal *sham*-CMC y de un animal *sham*-Am80. El marcaje de la médula espinal con lectina de tomate (A,E), Arg-I (B,F) y Gr-1 (C,D) no muestra la presencia de células infiltradas para ninguno de los marcadores (mezcla D,H), tanto en el caso de los animales CMC como en los tratados con Am80. La barra de escala representa 50 μ m en A-H.

Ambas subpoblaciones de células Gr-1⁺ presentaron morfología diferente. Así, las células con el fenotipo Arg-I⁺/Gr-1⁺ eran de morfología redondeada y con un citoplasma vacuolado, típica de las MDSCs de carácter macrofágico, mientras que las células Arg-I⁻/Gr-1⁺ tenían una morfología típica de neutrófilo, con el cuerpo celular redondeado, el núcleo polilobulado y citoplasma poco vacuolado. Por esta circunstancia, mantuvimos el criterio de clasificación de las células Arg-I⁺/Gr-1⁺ como MDSCs y de las células Arg-I⁻/Gr-1⁺ como neutrófilos (Fig. 40E-H y M-P).

El tratamiento con Am80 no afectó a las dimensiones del área infiltrada en la médula espinal de los animales EAE (Fig. 41A) y no indujo cambios en la densidad de MDSCs (Fig. 41B). Sin embargo, incrementó significativamente el número de células Gr-1⁺ totales debido,

principalmente, al aumento del número de células Arg-I⁺/Gr-1⁺ (Fig. 41B). De este modo, la administración de Am80 provocó una disminución significativa del porcentaje de células Arg-I⁺/Gr-1⁺ y un gran aumento del porcentaje de células Arg-I⁻/Gr-1⁺ con respecto al total de células Gr-1⁺ (Fig. 41C).

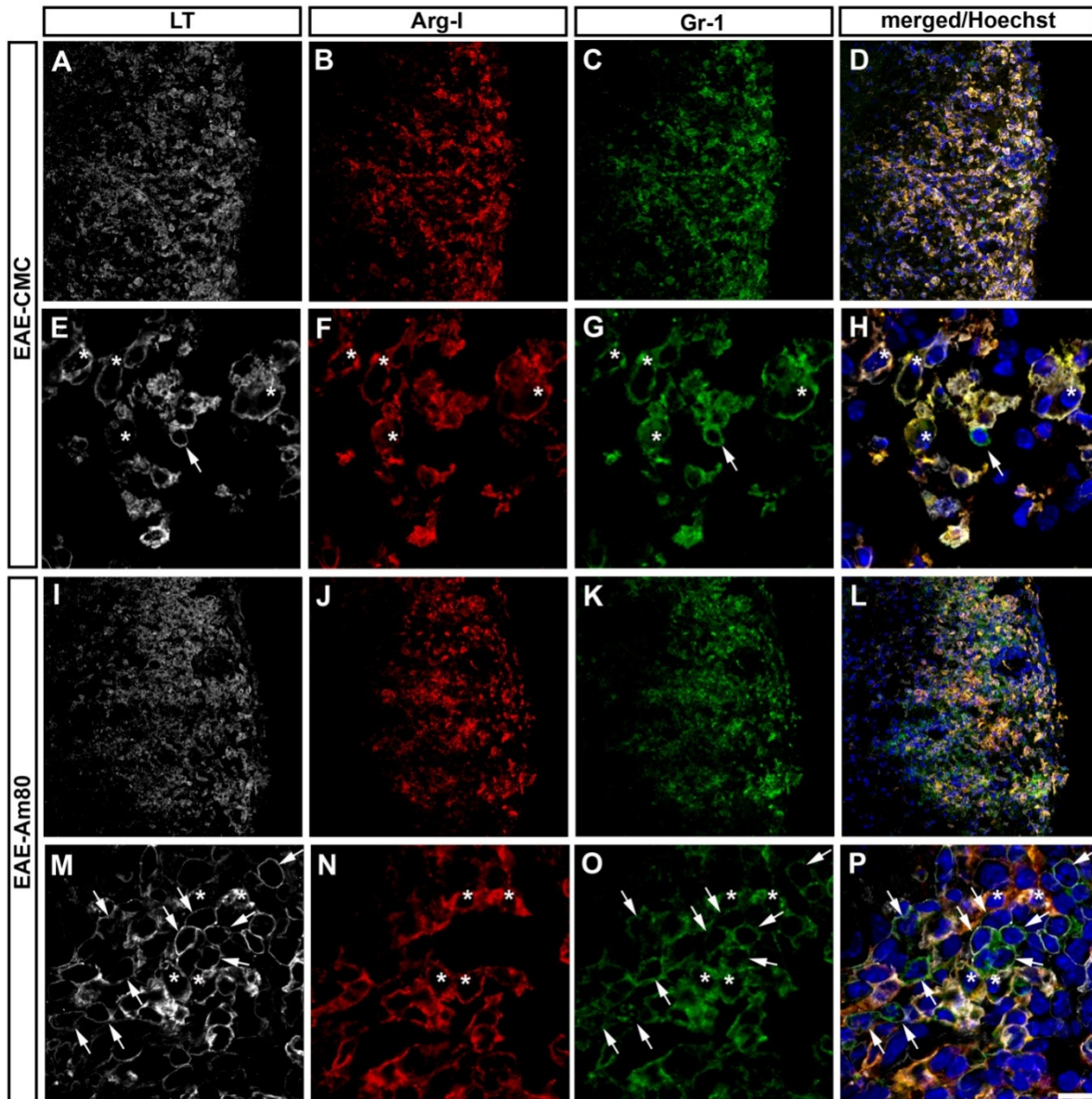


Figura 40: Am80 incrementa la densidad de células Arg-I⁺/Gr-1⁺ en la médula espinal de los ratones con EAE. El infiltrado celular marcado con lectina de tomate (LT) permite observar la presencia del infiltrado inflamatorio en los dos grupos de ratones EAE (A-H: EAE-CMC; I-P: EAE-Am80). La expresión de Arg-I (B,D,J,L) y Gr-1 (C-D,K-L) muestra la existencia de dos subpoblaciones celulares: células Arg-I⁺/Gr-1⁺ y células Arg-I⁻/Gr-1⁺. Las células Arg-I⁺/Gr-1⁺ son redondeadas y con citoplasmas altamente vacuolados (asteriscos en E-H y M-P). Las células Arg-I⁻/Gr-1⁺ presentan morfología redondeada con citoplasmas poco vacuolados y núcleos polilobulados, típicos de los neutrófilos (flechas en E-H y M-P). La barra de escala representa 50 μ m en A-D e I-L y 10 μ m en E-H y I-P.

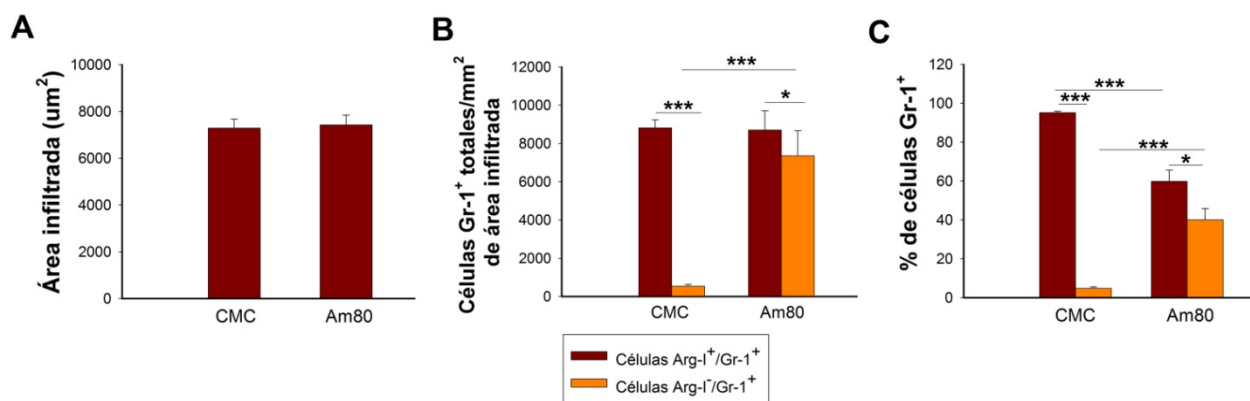


Figura 41: Cuantificación de las células Gr-1⁺ totales en la médula espinal de los ratones con EAE. El tratamiento con Am80 no produce cambios en la densidad de las células Arg-1⁺/Gr-1⁺ en los ratones EAE. En cambio, ocasiona un incremento significativo de la densidad células Arg-1⁻/Gr-1⁺ (A). La administración de Am80 provoca una disminución significativa en el porcentaje de células Arg-1⁺/Gr-1⁺ y aumenta el porcentaje de células Arg-1⁻/Gr-1⁺ respecto al total de células Gr-1⁺ (B). Am80 no produce cambios significativos en la superficie infiltrada de la médula espinal (C). Para los grupos analizados se ha realizado el test de la *t* de Student con valor de *p* significativo de **p*<0,05 y ****p*<0,001.

El uso del marcador específico de neutrófilos Ly6B.2 mostró que los ratones *sham* no presentaban inmunomarcaje para Ly6B.2, independientemente de si se les administró el fármaco o CMC, en sus médulas espinales (Fig. 42A-F). La médula espinal de los ratones con EAE tratados con Am80 o su vehículo expresó el marcador específico de neutrófilos Ly6B.2, localizado exclusivamente en el área infiltrada y sin que colocalizara en ningún caso con el marcador Arg-1, lo que permitió identificar dos poblaciones celulares diferentes: células Arg-1⁺/Ly6B.2⁻ y las células Arg-1⁻/Ly6B.2⁺. Estas últimas mostraban cuerpos celulares redondeados con citoplasmas poco vacuolados y con el núcleo polilobulado, idéntica a la morfología observada en las células Arg-1⁻/Gr-1⁺ (Fig. 43A-L). La cuantificación de las células Arg-1⁻/Ly6B.2⁺ mostró que el tratamiento con Am80 producía un incremento significativo en la densidad de estas células en los ratones con EAE (Fig. 43M), paralelo, nuevamente, al encontrado en las células Arg-1⁻/Gr-1⁺ (Fig. 40A-P).

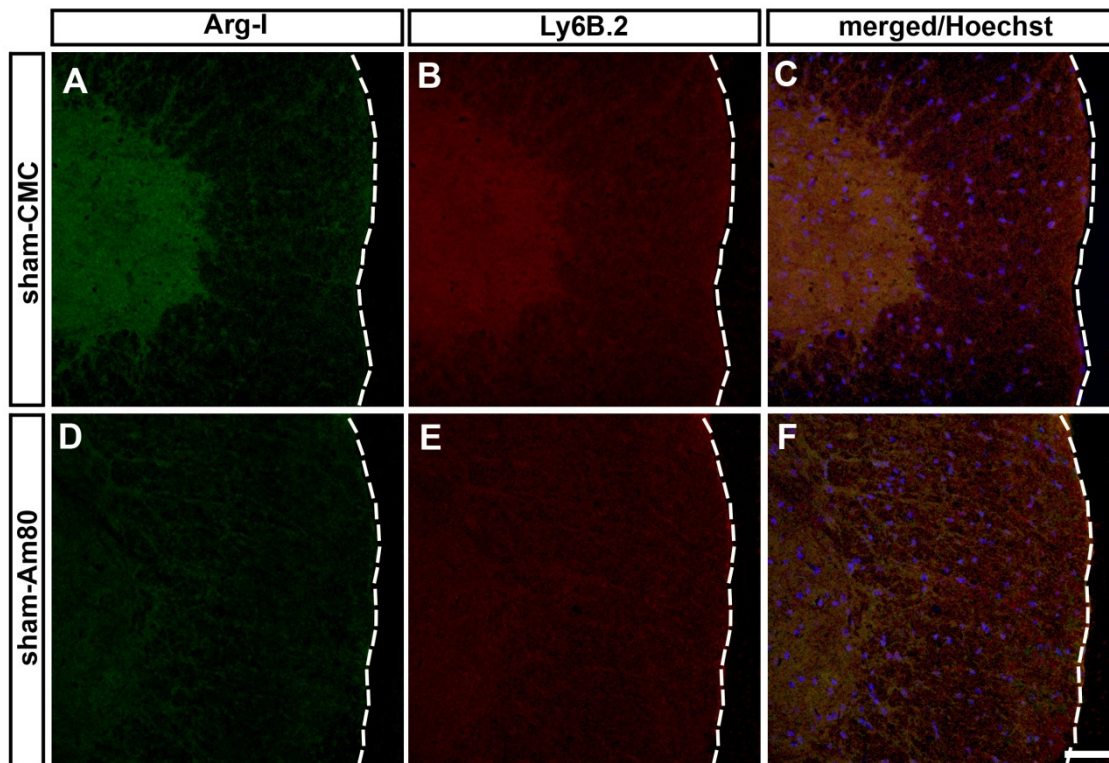


Figura 42: Am80 no afecta a la expresión del marcador de neutrófilos Ly6B.2 en los ratones *sham*. Detalle de una zona de la médula espinal de un ratón de los grupos CMC y Am80 (A-F), mostrando que Am80 no produce cambios en la expresión de Arg-I (en verde) y Ly6B.2 (en rojo). La barra de escala representa 50 μm en A-F.

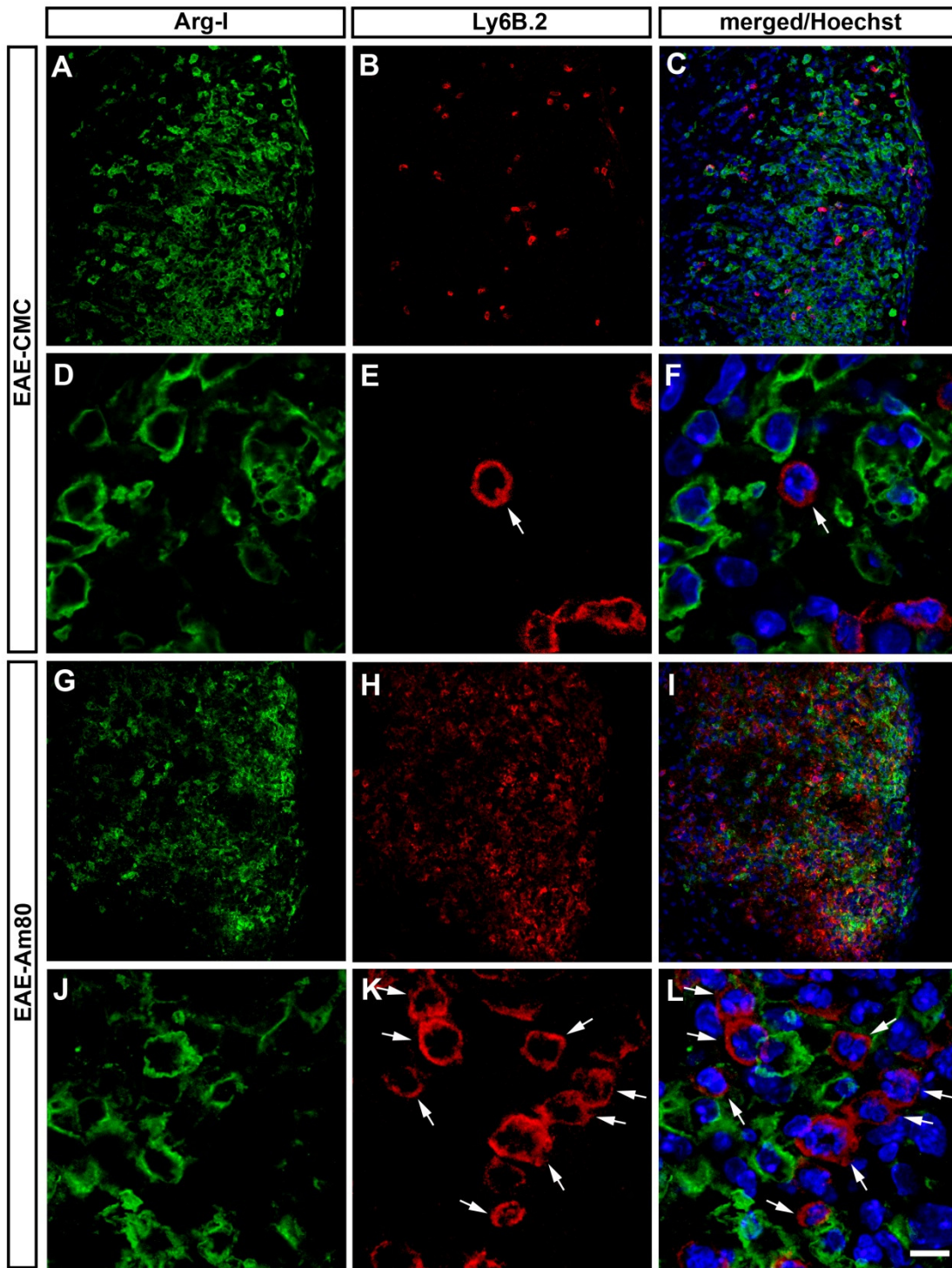
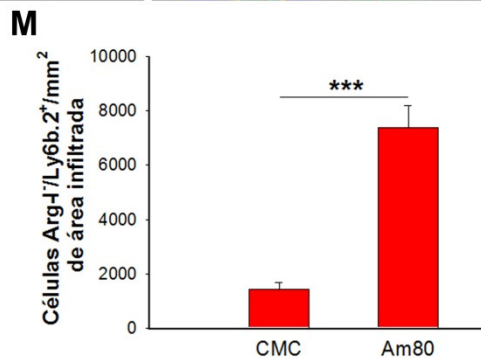


Figura 43: Am80 produce un aumento en el número de células Arg-I⁺Ly6B.2⁺ en la médula espinal de los ratones con EAE. El inmunomarcaje con Arg-I (**A,D,G,J**) y con el marcador de neutrófilos Ly6B.2 (**B,E,H,K**) muestra que Am80 no induce la co-expresión de ambos marcadores en el mismo tipo celular. Am80 incrementa el número de neutrófilos en los ratones con EAE (flechas en **K-L,M**) en comparación al grupo de ratones EAE-CMC (flecha en **E-F,M**). Para los grupos analizados se ha realizado el test de la *t* de Student con valor de *p* significativo de ****p*<0,001. La barra de escala representa 50 μ m en A-C y G-I; y 6 μ m en D-F y J-L.



Am80 induce un aumento de la densidad de las células mieloides totales en la médula espinal de los ratones con EAE

El tratamiento con Am80 no provocó cambios en la microglía CD11b⁺ residente en los ratones *sham* (Fig. 44A-F).

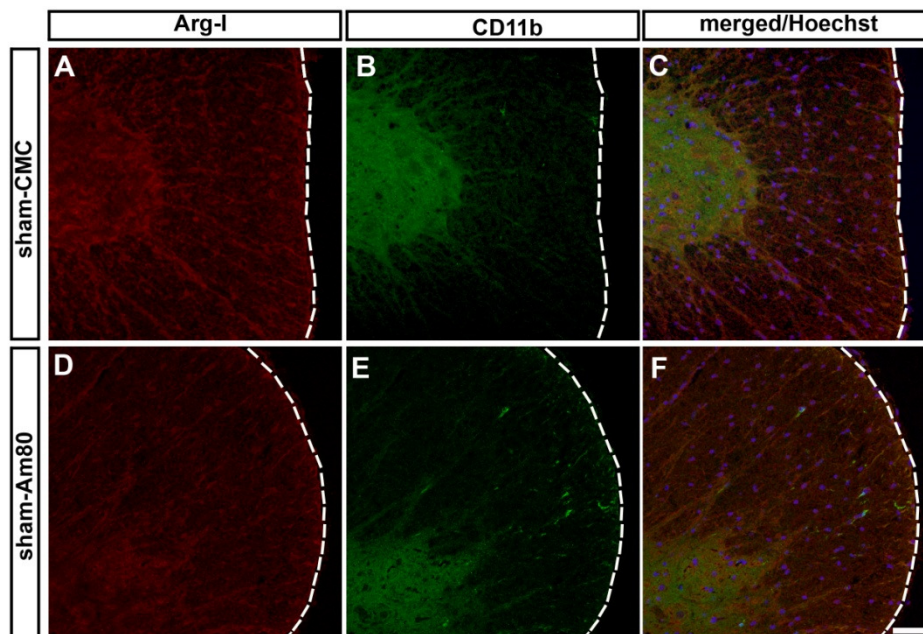


Figura 44: Am80 no induce cambios en la expresión de CD11b en la microglia de los ratones *sham*. Microfotografías de una zona de la médula espinal de un ratón *sham*- CMC (A-C) y un ratón *sham*-Am80 (D-F) inmunomarcada para Arg-I (rojo) y CD11b (verde). El análisis de colocalización muestra expresión de CD11b en la microglia residente (C,F). La barra de escala representa 50 μ m en A-F.

Los ratones con EAE para ambos grupos (CMC y Am80) presentaron en el área infiltrada de la médula espinal dos poblaciones celulares distintas: Arg-I⁺/CD11b⁺ y Arg-I⁻/CD11b⁺ (Fig. 45A-L). Las células Arg-I⁺/CD11b⁺ presentaban la morfología característica de MDSCs descrita en apartados anteriores, mientras que las células Arg-I⁻/CD11b⁺ presentaron un tamaño mucho menor y citoplasmas apenas vacuolado (Fig. 45D-F, J-L). El tratamiento con el fármaco provocó un aumento significativo en la densidad de las células CD11b⁺ totales en el área infiltrada desmielinizada de la médula espinal de los ratones con EAE, debido, básicamente, al aumento del número de células Arg-I⁻/CD11b⁺ (Fig. 45M). Esto cambios en la densidad de ambas poblaciones celulares se vió también reflejado en su

porcentaje respecto al total de células CD11b⁺, el cual disminuyó significativamente en el caso de las MDSCs (doblemente marcadas con Arg-1 y CD11b) y aumentó en el caso de las células Arg-1⁻/CD11b⁺ (Fig. 45N).

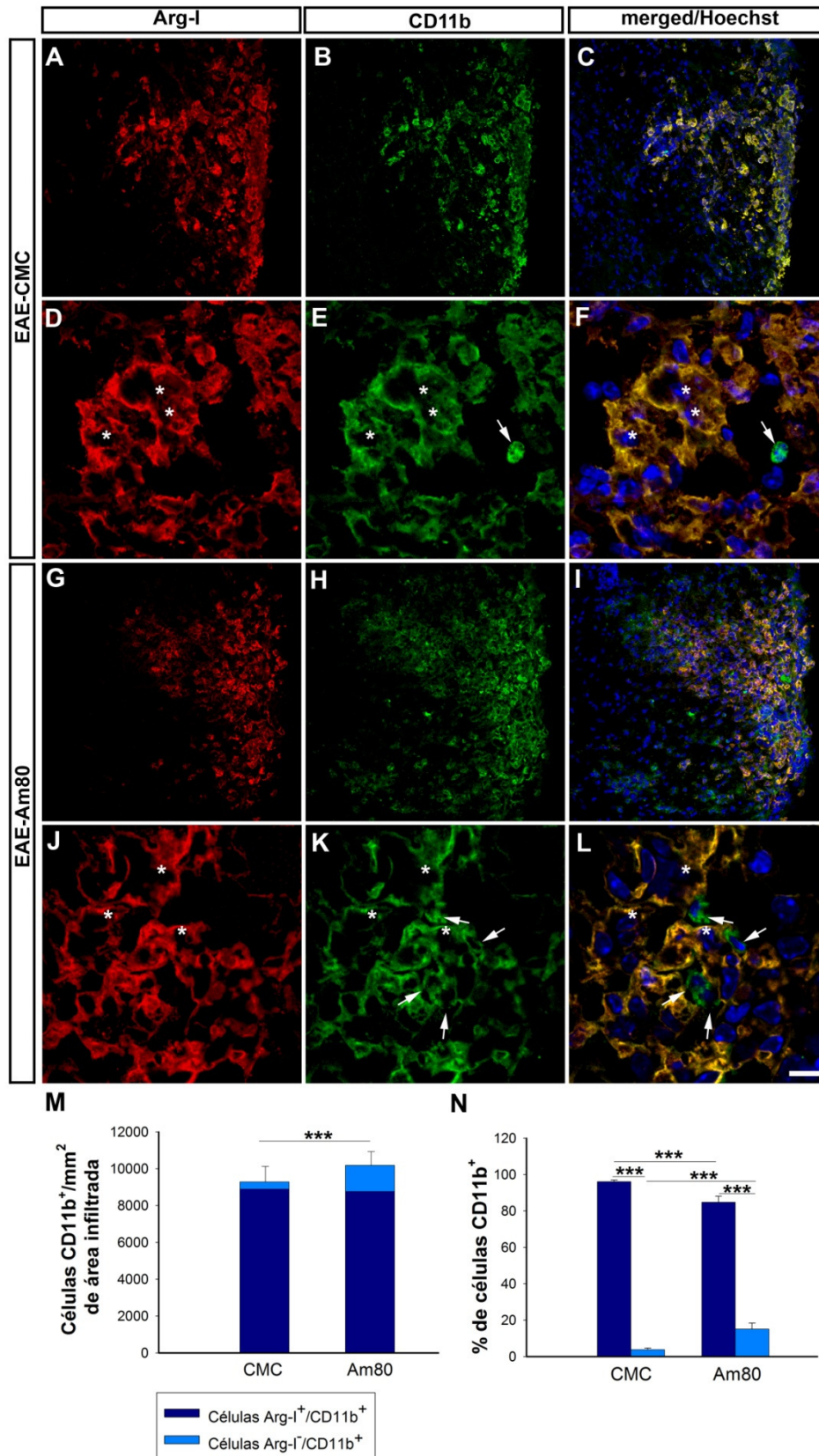


Figura 45: Am80 aumenta la densidad de las células CD11b⁺ en la médula espinal de los ratones con EAE.

El inmunomarcaje con Arg-I (A,D,G,J) y CD11b (B,E,H,K) muestra que todas las células Arg-I⁺ co-expresan CD11b en los ratones EAE-CMC y EAE-Am80 (merged: C,I). El tratamiento con Am80 incrementa la densidad de las células Arg-I/CD11b⁺ en el interior del área infiltrada (flechas en E-F, K-L). La densidad de células totales CD11b⁺ se incrementa significativamente en los ratones EAE tras el tratamiento con Am80 (M). Am80 produce una disminución significativa en el porcentaje de células Arg-I⁺/CD11b⁺ y un incremento significativo en el porcentaje de las células Arg-I/CD11b⁺ respecto al total de células CD11b⁺ en los ratones EAE (N). Para los grupos analizados se ha realizado el test de la *t* de Student con valor de *p* significativo de ****p*<0,001. La barra de escala representa 50 μm en A-C, 6 μm en D-F, 50 μm en G-I y 7 μm en J-L. **En la página anterior.**

Am80 promueve la apoptosis de las Células Supresoras Derivadas de Mieloides en la médula espinal de los ratones con EAE

Para determinar los efectos que tiene la administración de Am80 sobre las MDSCs (Arg-I⁺/Gr-1⁺) y los neutrófilos (Arg-I⁻/Gr-1⁺) en la médula espinal de los ratones con EAE, se realizó un estudio de proliferación y de apoptosis mediante el análisis de la distribución de PH3 y TUNEL, respectivamente. La administración de Am80 no indujo cambios en la expresión de PH3 en estos animales. Tanto en los ratones con EAE vehículo como en los tratados con el fármaco, los núcleos que presentaban signos de proliferación estaban localizados en el interior del área infiltrada, pero no eran MDSCs ni tampoco neutrófilos (Fig. 46A-P).

Sin embargo, el marcateo con TUNEL, combinado con el inmunomarcaje para Arg-I y Gr-1, mostró que el tratamiento con Am80 producía un incremento significativo de la densidad de MDSCs apoptóticas en la médula espinal de los ratones con EAE, sin que se observaran signos de apoptosis en la población de neutrófilos (Fig. 47A-H). La cuantificación del número total de células Arg-I⁺/Gr-1⁺ (MDSCs) y de células Arg-I⁻/Gr-1⁺ (neutrófilos) en ambos grupos de ratones EAE mostró cómo la administración de Am80 multiplicó significativamente por diez la densidad de MDSCs apoptóticas dentro del área infiltrada desmielinizada (Fig. 47I-J). Esto supuso un incremento significativo en el porcentaje de MDSCs en apoptosis (Fig. 47K). Por contra, el tratamiento con el fármaco no indujo cambios significativos en la densidad ni en el porcentaje de los neutrófilos en apoptosis (Fig. 47L-M).

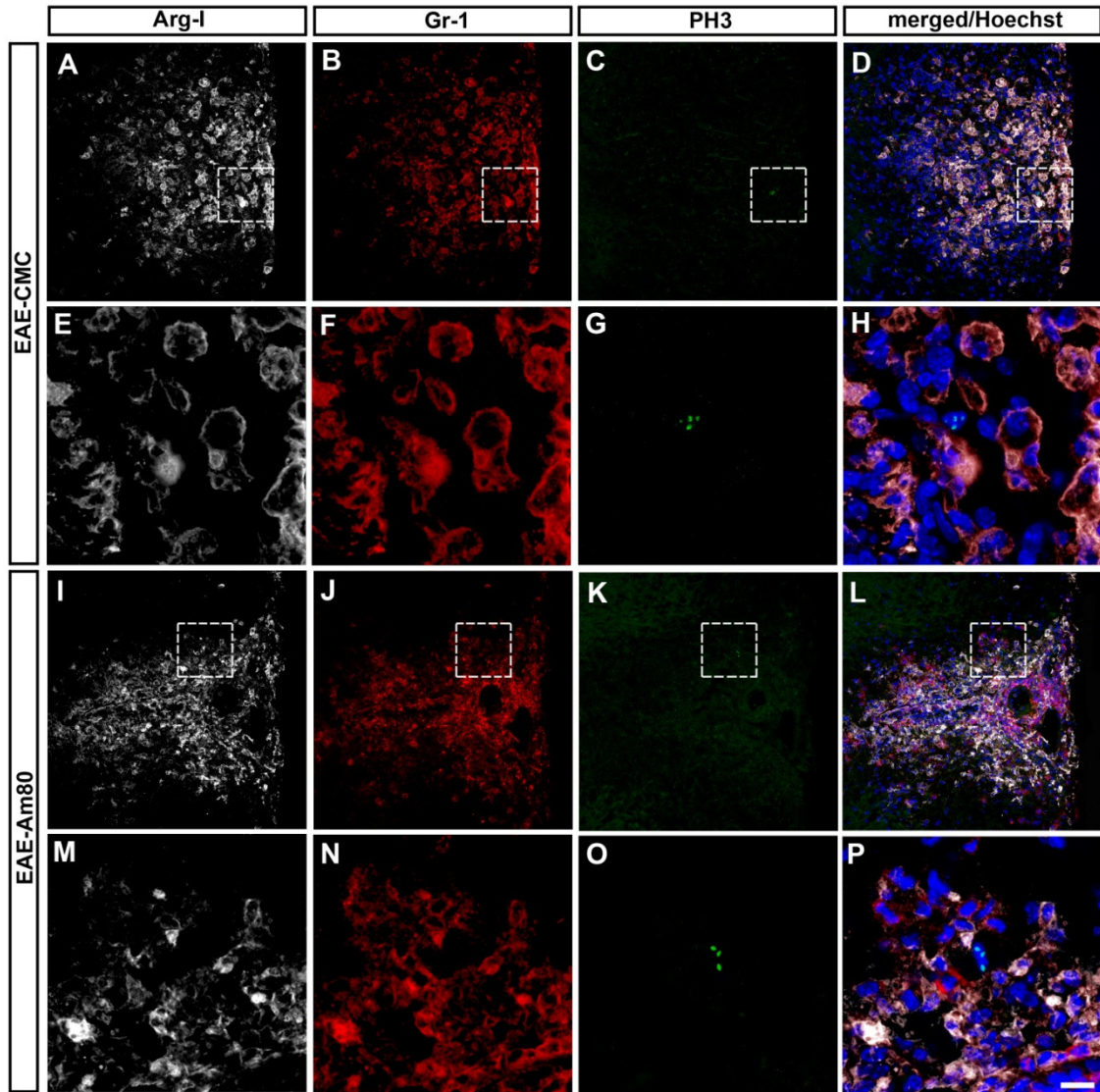


Figura 46: Am80 no afecta a la proliferación de las MDSCs ni a la de los neutrófilos en la médula espinal de los ratones con EAE. La administración de Am80 no induce cambios en la expresión ni en la distribución de PH3. El marcaje se localiza principalmente en el interior del área infiltrada de la médula espinal de los ratones EAE (**A-H:** EAE-CMC, **I-P:** EAE-Am80). El detalle del área enmarcada en los paneles (**A-D;** **I-L**) muestra que en ningún caso las MDSCs (células en blanco y rojo) y los neutrófilos (células sólo rojas) presentan colocalización con PH3 (verde). La barra de escala representa 40 μ m en A-D, 10 μ m en E-H, 40 μ m en I-L y 10 μ m en M-P.

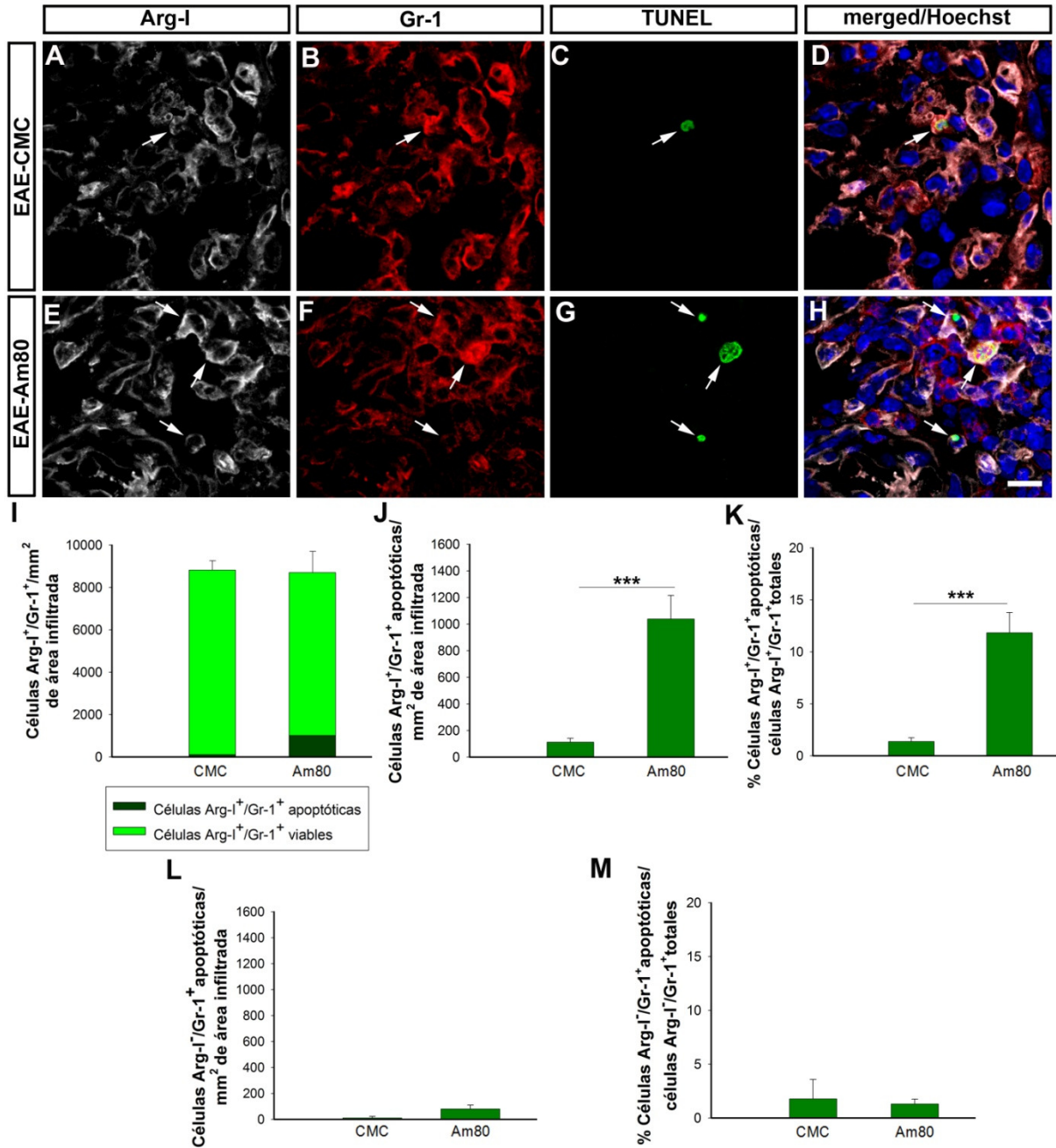


Figura 47: Am80 promueve la apoptosis de las MDSCs en los ratones EAE. Detalle representativo del área infiltrada de un ratón EAE que recibió CMC (A-D) o Am80 (E-H), inmunomarcada con Arg-1 (blanco), Gr-1 (rojo) y teñida con TUNEL (verde). Se observa que los ratones tratados con Am80 presentan una mayor presencia de células Arg-1⁺/Gr-1⁺ apoptóticas (flechas). Tras el tratamiento con Am80 se incrementa significativamente la densidad (I-J) como el porcentaje de las MDSCs apoptóticas respecto al total de MDSCs (K). Am80 no genera cambios significativos en la densidad (L) ni en el porcentaje de células Arg-1⁺/Gr-1⁺ en apoptosis respecto al total de células Arg-1⁺/Gr-1⁺ (M). Para los grupos analizados se ha realizado el test de la *t* de Student con valor de *p* significativo de ****p*<0,001. La barra de escala representa 6 μm en A-H.

Am80 incrementa la densidad de linfocitos T CD4 en la médula espinal de los ratones con EAE

En los ratones con EAE que recibieron el vehículo las MDSCs fueron mayoritariamente viables y los signos de apoptosis se observaron, principalmente, en la población de linfocitos T (Fig. 48A-D). Sin embargo, los ratones con EAE tratados con Am80 presentaron un incremento de células apoptóticas en la médula espinal, asociado, principalmente, a las células MDSCs-Arg-1⁺ y no a los linfocitos T (Fig. 48E-H). Al igual que lo observado en el bazo, la administración de Am80 incrementó significativamente la densidad de los linfocitos T CD4⁺ en la médula espinal de estos ratones (Fig. 48I) y disminuyó significativamente la densidad y el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ apoptóticos que representaban en el conjunto de la población total de linfocitos T CD4⁺ (Fig. 48J,K).

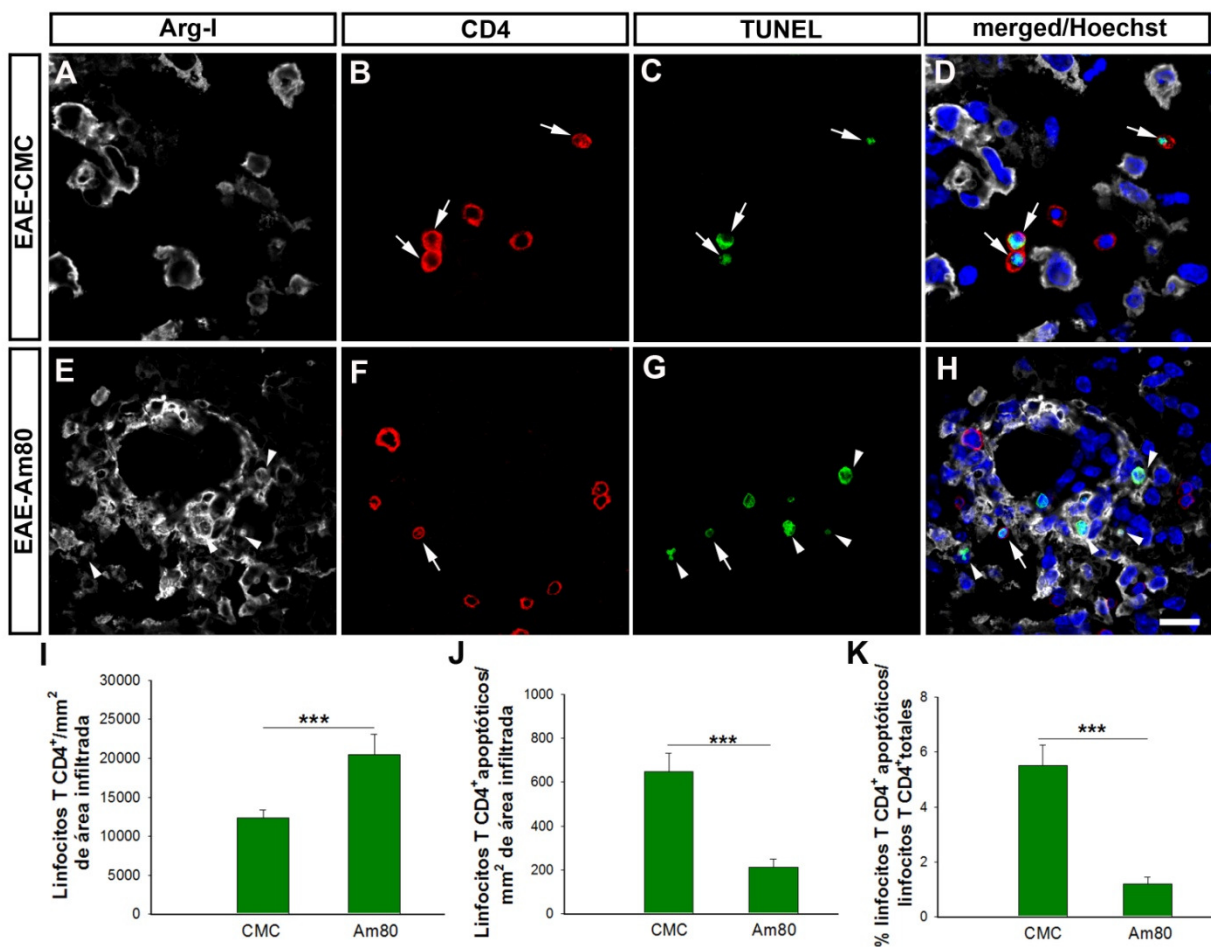
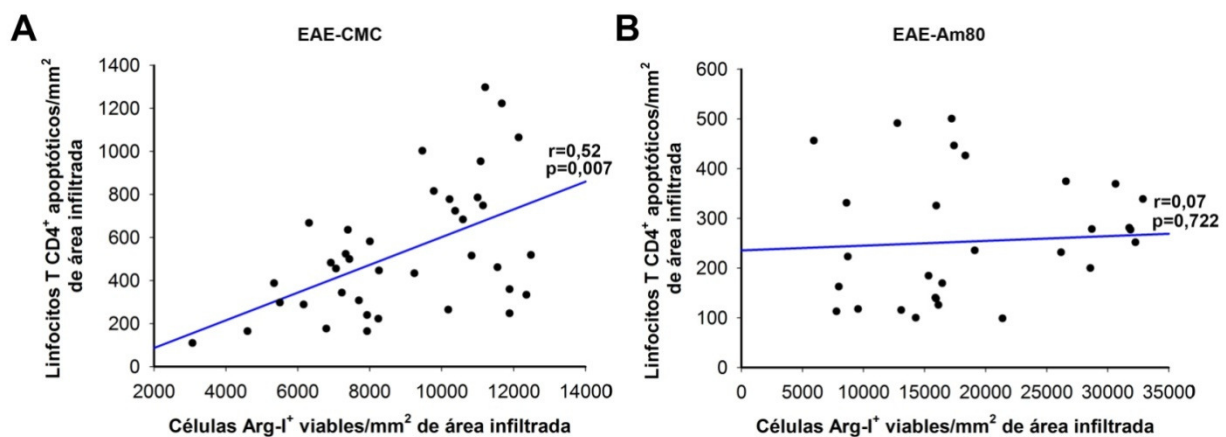


Figura 48: Am80 incrementa la densidad de linfocitos T viables en la médula espinal de los ratones con EAE.

Detalle del área infiltrada de la médula espinal de un ratón con EAE tratado con CMC (A-D) o con Am80 (E-H). El inmunomarcaje para Arg-I (en blanco) y CD4 (en rojo), junto con la técnica de TUNEL (en verde) muestra que tras el tratamiento con Am80, los signos de apoptosis están asociados principalmente a las MDSC-Arg-I⁺ (cabezas de flecha en E-H), mientras que, en los animales EAE-CMC los signos de apoptosis se observan principalmente en los linfocitos T (flechas en B-D y F-H). Am80 incrementa significativamente la densidad de linfocitos T CD4⁺ totales (I) y disminuye significativamente la densidad de linfocitos T CD4⁺ apoptóticos (J) y el porcentaje respecto al conjunto de la población total de linfocitos T CD4⁺ (K). Para los grupos analizados se ha realizado el test de la *t* de Student con valor de *p* significativo de ****p*<0,001. La barra de escala representa 7 μm en A-H. **En la página anterior.**

Además, los ratones con EAE tratados con Am80 no presentaron una correlación directa significativa entre la densidad de linfocitos T CD4⁺ apoptóticos y de células MDSC-Arg-I⁺ (Fig.49A-B).

**Figura 49: Am80 elimina la correlación entre la densidad de MDSCs y la de linfocitos T apoptóticos en los ratones EAE tratados.**

El test de correlación de Pearson entre la densidad de células Arg-I⁺ y la de linfocitos T CD4⁺ apoptóticos muestra que existe una correlación directa y significativa entre ambas poblaciones de células en los ratones EAE vehículo (A), que no se aprecia en los ratones EAE tratados con Am80 (B). Para los dos grupos de ratones analizados se ha realizado el test de correlación de Pearson con valor de *p* significativo de ***p*<0,01.

Así mismo, la administración de Am80 hizo que disminuyera de manera significativa la densidad de linfocitos T CD8⁺ en los ratones con EAE (Fig. 50A), sin afectar ni a la cantidad de linfocitos T CD8⁺ apoptóticos ni al porcentaje que éstos representaban dentro del total de linfocitos T CD8⁺ (Fig. 50B,C).

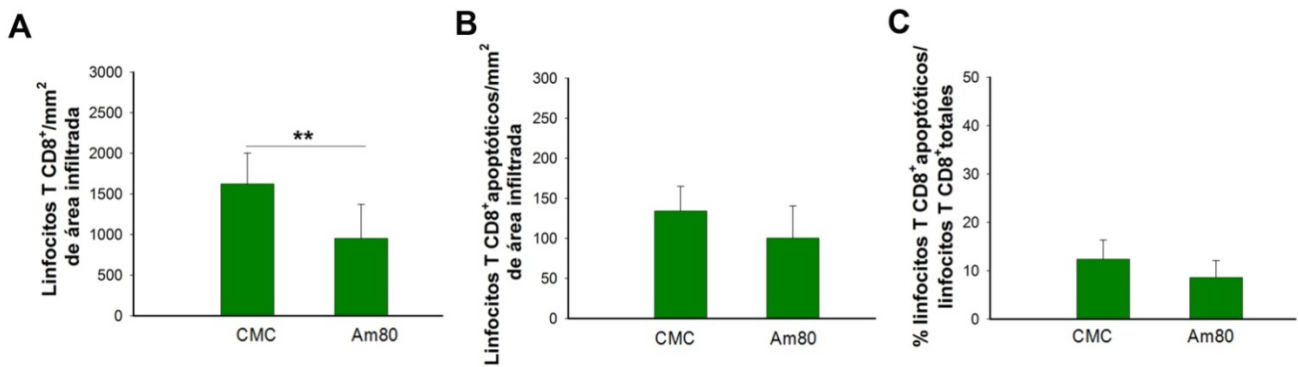


Figura 50: Am80 no afecta a la viabilidad de los linfocitos T CD8⁺. La densidad de linfocitos T CD8⁺ disminuye significativamente en los ratones EAE debido a la administración de Am80 (**A**). Sin embargo, tanto la densidad de linfocitos T CD8⁺ apoptóticos (**B**) como el porcentaje de éstos respecto al total de linfocitos T CD8⁺ (**C**) no sufre cambios significativos con este tratamiento. Para los grupos analizados se ha realizado el test de la *t* de Student con valor de *p* significativo de $**p < 0,01$.

Nuestros resultados confirman que el tratamiento con Am80 a los ratones con EAE afecta a la población de células mieloides tanto en el bazo como en su médula espinal, debido a que el fármaco promueve el incremento en la apoptosis de las MDSCs, el aumento en el porcentaje de células mieloides totales y de neutrófilos. A todo esto debemos sumar el incremento de la densidad de linfocitos T viables en estos animales, lo que indica que se está produciendo una respuesta inmune más agresiva, y con ello, agravándose el curso clínico de la enfermedad.

DISCUSIÓN

I- Caracterización de las Células Supresoras Derivadas de Mieloides en la EAE

El análisis histológico de la médula espinal de los ratones sham y con EAE muestra por primera vez *in vivo* la presencia de células Arg-I⁺, las cuales se localizan, exclusivamente, en el área desmielinizada e infiltrada de los ratones con EAE. Además, su densidad a lo largo del curso temporal de la EAE es transitoria, son muy abundantes al final del periodo de incremento de los síntomas clínicos (15 dpi), escasas al final del periodo de recuperación parcial de los síntomas clínicos (25 dpi) y desaparecen por completo desde el inicio del periodo crónico (Fig. 51). Estos datos corroboran y, además, complementan los estudios de expresión génica de *arg-1* y de su actividad en EAE descritos anteriormente (Carmody et al., 2002; Xu et al., 2003). La presencia transitoria espacio-temporal que muestran las células Arg-I⁺ en la médula espinal de los ratones con EAE sugiere que estas células irrumpen en el SNC para actuar justo en el periodo clave en que se regula la respuesta autoinmune, en nuestro caso, alrededor de los 15 dpi. Además, estas células no invaden otras zonas del parénquima del SNC, con lo cual indica que ejercen su función inmunomoduladora, principalmente, en el interior del foco inflamatorio. El principal mecanismo de inmunosupresión descrito en las MDSCs está relacionado con la expresión de la enzima Arg-I (Bronte y Zanovello, 2005; Talmadge, 2007; Cuenca et al., 2011). Diversos estudios en cáncer e infecciones muestran que la expansión y activación de las MDSCs están controladas por factores de crecimiento (M-CSF y GM-CSF), secretados por las propias células del tumor, y por mediadores inflamatorios (IFN γ o diversas ILs), producidos por los linfocitos T, que atraen a las MDSCs al foco inflamatorio (Ostrand-Rosenberb y Sinha, 2009; Sander et al., 2010). Por tanto, el microambiente inflamatorio que presenta el interior del SNC cuando éste es invadido por los linfocitos T, u otras células inmunes, produciendo diversos mediadores inflamatorios puede ser la causa por el que las MDSCs sean atraídas hacia el área desmielinizada infiltrada, donde se concentran casi exclusivamente, sin que invadan otras zonas del parénquima del SNC.

Tanto al final del periodo de incremento de los síntomas clínicos (15 dpi) como al final del periodo de recuperación parcial de los mismos (25 dpi), todas las células Arg-I⁺ presentes en la médula espinal de los ratones con EAE expresan también los marcadores Gr-1 y CD11b, empleados habitualmente para la identificación de las MDSCs murinas en diferentes condiciones patológicas (Gabrilovich et al., 2001; Goñi et al., 2002; Bronte et al., 2003b; Bronte y Zanovello, 2005; Makarenkova et al., 2006; Talmadge, 2007; Gabrilovich et al., 2012). La expresión de ambos marcadores indica que estas células son una subpoblación celular mielóide inmadura, con características intermedias entre granulocitos y monocitos, lo que nos permite identificarlas como MDSCs.

Diversos estudios en cáncer han permitido una mejor clasificación de las MDSCs gracias a la identificación de los dos epítomos de Gr-1, Ly-6C y Ly-6G, que discrimina dos poblaciones de MDSCs diferentes: las MDSCs de naturaleza granulocítica, con fenotipo CD11b⁺/Ly-6G⁺/Ly-6C^{low} y las MDSCs de naturaleza monocítica, con fenotipo CD11b⁺/Ly-6C^{high}/Ly-6G⁻, ambas con propiedades inmunosupresoras (Hestdal et al., 1991; Zehntner et al., 2005; Youn et al., 2008; Movahedi et al., 2008; Youn y Gabrilovich, 2010). En cambio, en el modelo de EAE en ratones de la cepa BALB/c, el bazo presenta tres poblaciones celulares de naturaleza y funciones supresoras diferentes: las células CD11b⁺/Ly-6C^{low}/Ly-6G⁻ (clasificadas como una población mixta de monocitos y eosinófilos), las células CD11b⁺/Ly-6C^{int}/Ly-6G⁺ (clasificadas como neutrófilos) y, por último las células, CD11b⁺/Ly-6C^{high}/Ly-6G⁻ (clasificadas como monocitos con propiedades supresoras: MDSCs; Zhu et al., 2007). Siguiendo estos mismos criterios de clasificación, en la médula espinal de los ratones con EAE, al final del periodo de incremento de los síntomas clínicos, encontramos dos subpoblaciones de células mieloides diferentes, las cuales hemos identificado como MDSCs y neutrófilos, predominando claramente las primeras. Debido a la imposibilidad de reconocer ambos epítomos de Gr-1 *in vivo*, recurrimos al marcador CD115, específico de la línea monocítica y propio de las MDSCs con funciones altamente supresoras (Gallina et al., 2006; Huang et al., 2006). La expresión de CD115 en todas las células Arg-I⁺ y la ausencia en todas ellas del marcador característico de neutrófilos, Ly6B.2 (Wu et al., 2010), junto con la

morfología celular, nos confirmó que las MDSCs presentes en la médula espinal de los ratones con EAE son de naturaleza monocítica y altamente supresora.

En el modelo de EAE, el que las MDSCs expresen Arg-I es un indicativo de que estas células están activas y están realizando la inmunosupresión sobre los linfocitos T, ya que la expresión de esta enzima se ha relacionado con la capacidad que tienen las MDSCs para inhibir la proliferación de los citados linfocitos T (Bronte y Zanovello, 2005). Pero además, las MDSCs pueden expresar conjuntamente la enzima iNOS. De este modo, las MDSCs aisladas de ratones *knock-out* para *Stat1*, que no expresan Arg-I ni iNOS, pierden su capacidad de inhibir a los linfocitos T (Kusmartsev y Gabrilovich, 2005). En nuestro estudio, el 97% de las MDSCs presentes en la médula espinal de los ratones con EAE expresan conjuntamente las enzimas Arg-I e iNOS, lo que indica que podrían estar participando en la supresión de los linfocitos T, principalmente, induciendo su apoptosis (Gabrilovich et al., 2012). Esto se debe a que la actividad de ambas enzimas genera O_2^- y ON, que a su vez dan lugar a peroxinitritos y ROS, que inducen la expresión de marcadores apoptóticos, como el CD95L en el linfocito T (Gabrilovich et al., 2001; Rodríguez et al., 2003; Bronte y Zanovello, 2005; Munder et al., 2006; Gabrilovich et al., 2012). Por tanto, la gran mayoría de las MDSCs presentes en la médula espinal de nuestros ratones con EAE podrían estar induciendo la apoptosis de los linfocitos T, suprimiendo así la respuesta autoinmune en los periodos claves para que ésta ocurra, en nuestro caso 15 y 25 dpi.

Los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ apoptóticos están presentes en las médulas espinales de los ratones con EAE en los mismos periodos experimentales en los que las MDSCs también están presentes. Así mismo, ambas subpoblaciones de linfocitos T apoptóticos exhiben una densidad y un porcentaje significativamente mayor a 15 dpi, periodo en el que la densidad de MDSC-Arg-I⁺ es máxima. La correlación directa observada entre la densidad de MDSC-Arg-I⁺ y la de linfocitos T CD4⁺ apoptóticos a 15 dpi sugiere que las MDSCs ejercen sus funciones inmunosupresoras en el SNC induciendo la apoptosis de los linfocitos T justo al final del periodo de incremento de los síntomas clínicos y que, además, dicha

inmunosupresión la realizan, preferentemente, sobre los linfocitos T CD4⁺ y, en menor medida, sobre los linfocitos T CD8⁺ (Fig. 51).

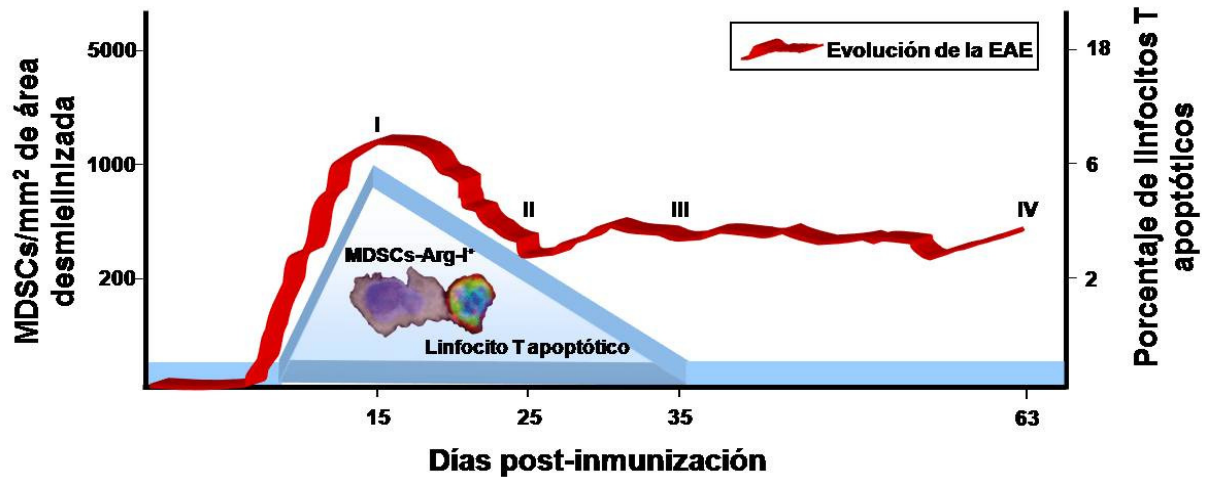


Figura 51: La densidad de MDSCs y el porcentaje de linfocitos T apoptóticos en la médula espinal presentan un paralelismo con el curso clínico de la EAE. Las MDSCs inducen la apoptosis de los linfocitos T alrededor del periodo de máxima sintomatología clínica (15 dpi), momento en el que el número de MDSCs alcanza su máximo en la médula espinal (I). El incremento de la apoptosis de los linfocitos T promueve la recuperación de los síntomas clínicos hasta el final del proceso de inmunoregulación a 25 dpi, donde se observa que el número de MDSCs y de linfocitos T apoptóticos en la médula espinal ha disminuido (II). Durante la fase crónica, ni en su etapa temprana (35 dpi; III) ni en el estadio más avanzado (63 dpi; IV), al igual que en los animales *sham*, vuelve a no detectarse MDSCs en la médula espinal de los ratones con EAE.

Así mismo, el co-cultivo de las MDSCs, extraídas de la médula espinal de los ratones con EAE en el periodo máximo de discapacidad, con linfocitos T activados corrobora que las MDSCs inducen la apoptosis de los linfocitos T activados, sin que se vea modificada la proliferación de estas últimas células. Al igual que se observa en cáncer y, recientemente, en el modelo de EAE, las MDSCs únicamente inducen la apoptosis de los linfocitos T activados y no sobre los linfocitos T sin activar (Huang et al., 2006; Yang et al., 2006a; Serafini et al., 2008; Zhu et al., 2011; Moliné-Velázquez et al., 2011). La actuación supresora de las MDSCs únicamente sobre los linfocitos T autorreactivos, sin que se vean afectados los linfocitos T no activados, impediría la eliminación de estos últimos como se observa, por ejemplo, en el SIDA donde hay una exagerada apoptosis de esta línea celular (Thompson, 1995). Así mismo, la médula espinal de los ratones con EAE muestra escasos núcleos

PH3⁺ que, además, no pertenecen en ningún momento a la población de células Arg-I⁺ ni a la de linfocitos T CD4 o CD8. Estos datos complementan los resultados obtenidos por Bauer et al. (1998), en los que describen una escasa proliferación de los linfocitos T en el parénquima de la médula espinal de los ratones con EAE mediante el marcador PCNA (Antígeno de proliferación nuclear) y con la incorporación de BrdU, ambos específicos de la fase de síntesis del ciclo celular. Con estos resultados corroboramos estudios previos en el modelo de EAE que asocian la recuperación espontánea de los signos clínicos con la apoptosis de los linfocitos T, así como su escasa proliferación en el interior del área desmielinizada durante la fase de mayor actividad sintomatológica de la enfermedad (Pender et al., 1991; Pender et al., 1992; Schmied et al., 1993; Bauer et al., 1998; Pender y Rist, 2001; Bronte y Zanovello, 2005).

Por otro lado, un pequeño porcentaje de células presentes en la médula espinal de los ratones con EAE expresaron únicamente una de las dos enzimas, Arg-I o iNOS. Normalmente, la expresión exclusiva de iNOS está asociada a la subpoblación de macrófagos tipo M1, y la de Arg-I se asocia a la subpoblación de macrófagos tipo M2 (Gordo, 2003; Gordon y Taylor, 2005; Bronte y Zanovello, 2005; Varin y Gordon, 2009; Gabrilovich et al., 2012). Por tanto, el pequeño porcentaje de células que expresan una sola de estas enzimas podría ser macrófagos maduros de activación clásica (M1, con funciones pro-inflamatorias), o de activación alternativa (M2, con funciones anti-inflamatorias y reparadoras del tejido).

Diversos estudios *in vitro* muestran que es imprescindible el contacto celular para que las MDSCs induzcan la apoptosis de los linfocitos T (Apolloni et al., 2000; Zhu et al., 2007; Dardalhon et al., 2010; Slaney et al., 2011). Nuestro estudio es el primero que demuestra *in vivo* la presencia de esta relación espacial entre las MDSCs y los linfocitos T apoptóticos en la médula espinal de los ratones con EAE. Así, hemos observado que justo al final del periodo de incremento de los síntomas clínicos y al final del periodo de recuperación sintomatológica (15 y 25 dpi, respectivamente; Fig. 51), la mayoría de los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ apoptóticos se encuentran en contacto directo con las MDSCs-Arg-I⁺, aunque a 25

dpi la densidad de MDSCs ya sea significativamente menor. Esto puede ser debido a que el contacto celular establecido por las MDSCs sea diferente dependiendo de qué subpoblación de linfocitos T se trate. Así, la capacidad de inmunosuprimir a los linfocitos T CD8⁺ está únicamente relacionada con la expresión de MHC-I en la superficie de las MDSCs (Gabrilovich et al., 2012), mientras que la inmunosupresión sobre los linfocitos T CD4⁺ puede ser: a) mediante antígeno-especificidad, debido a la baja expresión de moléculas MHC-II; b) mediante mecanismos no antígeno-específicos por la expresión de CD95L o TIM3, que indica también la necesidad del contacto célula a célula; ó c) mediante los productos generados del metabolismo de la L-Arginina, y de la disminución de ésta en el medio extracelular, que media la inmunosupresión por liberación de productos solubles sin necesidad del contacto celular directo (Gabrilovich et al., 2012). Por todo ello, cuando a 25 dpi disminuye la densidad de MDSCs en la médula espinal de los ratones con EAE, estas células podrían inmunosuprimir a los linfocitos T CD4⁺ sin necesidad de contacto celular directo; en cambio, para producir la inmunosupresión sobre los linfocitos T CD8⁺ siempre es necesario el contacto entre ambas células mediante el complejo MHC-I.

Al final del periodo de recuperación parcial de los síntomas clínicos (25 dpi), encontramos que la densidad de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ viables es mayor que a 15 dpi y que, además, los linfocitos T CD8⁺ presentan una correlación inversa con la densidad de MDSC-Arg-I⁺. Sin embargo, a pesar de ello, la inmunosupresión de la respuesta autoinmune se mantiene en los ratones con EAE, lo que indica la presencia de otros mecanismos inmunosupresores en los que también podrían participar las MDSCs. De hecho, las MDSCs tienen la capacidad de inducir la expansión clonal de las células Treg naturales antígeno-específicas y de polarizar a los linfocitos T CD4⁺ vírgenes a células Treg inducidas (Huang et al., 2006; Serafini et al., 2008; Pan et al., 2008). Este mecanismo inmunosupresor de las MDSCs se realiza por contacto celular directo con los linfocitos T mediante la interacción del receptor CD40 y su ligando (CD40L), mediante la producción de factores solubles (IFN γ , IL-10 y TGF β) por parte de las MDSCs debido principalmente a su expresión de Arg-I (Huang et al., 2006; Serafini et al., 2008; Pan et al., 2008). Esto último apoya que Arg-I sea un

marcador idóneo para identificar a las MDSCs en el modelo de EAE, ya que la expresión de esta enzima indica que las MDSCs tienen la capacidad de suprimir a los linfocitos T y, además, la capacidad de inducir a las células Treg. Diversos trabajos muestran que las células Treg tienen la capacidad de suprimir la respuesta autoinmune inhibiendo la respuesta pro-inflamatoria de los linfocitos T autorreactivos (Groux, 2001; Vignali et al., 2008). Así, durante el periodo de recuperación de los síntomas clínicos de la EAE, se incrementa el número de células Treg en el SNC que favorecen la recuperación de los síntomas clínicos no sólo por la supresión de la respuesta del linfocito T, sino también mediante la inducción de células B reguladoras (Groux, 2001; McGeachy et al., 2005; ; Mann et al., 2007; Korn et al., 2009). Además, en el modelo de EAE, las células Treg representan dos subpoblaciones de células según la expresión de los marcadores CD4 y CD8 (Najafian et al., 2003; Chen et al., 2009). Por tanto, todos estos datos sugieren que, al final del periodo de recuperación parcial de los síntomas clínicos (25 dpi), las MDSCs podrían haber inducido la expansión de los linfocitos Treg, tanto de los CD4 como de los CD8, para seguir con el proceso regulador de la respuesta autoinmune, lo que explicaría que dichas poblaciones celulares se mantengan, como es el caso de los linfocitos T CD4⁺, o aumenten, como en el caso de los linfocitos T CD8⁺.

A la vista de todos estos datos, nuestros resultados confirman que las células Arg-I⁺ observadas durante el curso clínico de la EAE son MDSCs y que, tras su llegada masiva al área desmielinizada infiltrada de la médula espinal de los ratones inmunizados, participan en la inducción de la apoptosis de los linfocitos T, justo al final del periodo de incremento de los síntomas clínicos, a 15 dpi, promoviendo la transición al periodo de recuperación sintomatológica (Fig. 51). Todas estas características inmunomoduladoras observadas en el modelo animal de EM convierten a las MDSCs en candidatas idóneas para la realización de ensayos farmacológicos que, bien induciéndolas, bien activándolas y/o movilizándolas hacia las zonas desmielinizadas, pudieran favorecer y/o acelerar la transición hacia la fase de remisión de la EM y, con ello, limitar el daño.

X

II- Modulación de las Células Supresoras Derivadas de Mieloides endógenas

Durante años, la modulación de las MDSCs se ha encaminado principalmente hacia el descubrimiento de terapias farmacológicas que las eliminen o que les impida llevar a cabo su función inmunosupresora en cáncer (Ugel et al., 2009). Esto dificulta la elección de un fármaco que aumente su número o que favorezca en ellas sus funciones inmunosupresoras en el modelo animal de EM. Como un primer paso hacia la confirmación de este tipo celular como futuro agente terapéutico endógeno, utilizamos un análogo sintético del ácido retinoico, por sus probados usos terapéuticos en determinadas patologías, conocido como tamibaroteno o Am80, fármaco generado como sustituto del ATRA (Cornic et al., 1994b; Zhou et al., 1998; Ohnishi, 2007; Sastre et al., 2007; Tallman y Altman, 2009). Aunque, en la EAE, lo que determina realmente los efectos terapéuticos o no del fármaco es el momento de su administración. Así, cuando Am80 es administrado antes de la aparición de los síntomas clínicos, los ratones presentan una EAE de curso clínico menos severo (Klemann et al., 2009). Sin embargo, la administración de Am80 cuando la respuesta autoinmune ya se ha iniciado y, además, a largo plazo muestra que los ratones con EAE presentan un curso clínico crónico desde el inicio del tratamiento (Klemann et al., 2009).

El presente trabajo muestra por primera vez en el modelo de EAE los efectos que produce la administración de Am80 sobre la población de MDSCs. El momento de administración de Am80 comenzó antes de ver signos efectivos de inmunosupresión. El periodo elegido fue esencial, ya que para poder establecer el verdadero papel de las MDSCs durante la EAE se requiere de varios factores: a) que la respuesta autoinmune se haya generado previamente; b) que las MDSCs estén presentes en el SNC; c) que dichas células, debido a la plasticidad funcional que presentan, estén en la fase de inducción de apoptosis de los linfocitos T, que ocurre cerca de la máxima manifestación de los síntomas clínicos como describen Lee et al. y Zhu et al. en 2011. Así, las MDSCs extraídas del bazo de los ratones con cáncer en el inicio de la enfermedad funcionan como APCs, mientras que las MDSCs extraídas en un periodo clínico más activo de la enfermedad pierden la

capacidad de presentar el antígeno y, en cambio, presentan propiedades inmunosupresoras (Lee et al., 2011). En el modelo de EAE, también hay evidencias de la plasticidad que presentan las MDSCs durante el curso clínico de la enfermedad: de este modo, las IMCs extraídas del SNC en el inicio de los síntomas clínicos funcionan principalmente como APCs, mientras que las IMCs extraídas en el momento de mayor valor en la escala clínica se comportan como MDSCs (Zhu et al., 2011).

Pero además de elegir el momento clínico idóneo, es importante que la duración del tratamiento sea lo suficientemente larga como para afectar a las MDSCs. Se ha descrito que el tratamiento con ATRA de al menos 3 días a ratones a los que se les ha inducido un cáncer es suficiente para producir la maduración de las MDSCs hacia granulocitos (Kusmartsev et al., 2003). De este modo, administramos Am80 a los ratones con EAE durante cinco días, tiempo suficiente para asegurar que el fármaco actúa sobre las MDSCs y que, además, los ratones con EAE-CMC presentaran signos sintomatológicos evidentes de inmunosupresión.

El tratamiento con Am80 no induce cambios en el fenotipo, densidad y morfología de las MDSCs presentes en la médula espinal de los ratones con EAE. En cambio, el tratamiento produce en estas células un incremento significativo en los signos de apoptosis en comparación con los ratones vehículo, disminuyendo, por tanto, la densidad de MDSCs viables en la médula espinal de los ratones con EAE. Los datos morfológicos obtenidos también se ven reflejados en el bazo, donde se aprecia una disminución en el porcentaje de MDSCs en el conjunto total de esplenocitos y de células mieloides. Además, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos *in vitro* con la línea celular mielóide HL-60 (empleada para estudiar la leucemia promielocítica aguda), en donde la administración de Am80 durante 9 días produce su apoptosis a través del incremento de la expresión de los receptores RAR α (Jimi et al., 2007). Nuestros resultados muestran que el fármaco induce la apoptosis de las MDSCs en el periodo clave para que desplieguen sus funciones inmunosupresoras sobre los linfocitos T, lo que origina un curso clínico crónico sin signos de recuperación sintomatológica durante todo el tratamiento (Fig. 52). De todo lo anterior se

infiere que el descenso en el porcentaje de viabilidad de las MDSCs podría influir de manera determinante en el proceso regulador de la respuesta autoinmune que llevan a cabo estas células y, por ende, en el curso de la enfermedad.

Diversos estudios muestran que las MDSCs inhiben la citotoxicidad de las células NK mediante fenómenos de contacto celular (Huang et al., 2006; Suzuki et al., 2008; Li et al., 2009; Elkabets et al., 2010). Así mismo, los macrófagos de tipo M1 presentes en el microambiente local de los tejidos se polarizan marcadamente a macrófagos anti-inflamatorios M2 cuando entran en contacto con las MDSCs (Cao et al., 2002; Sinha et al., 2007). Esto es debido a la menor producción de IL-12 por los macrófagos cuando entran en contacto con las MDSCs (Cao et al., 2002; Sinha et al., 2007). Además, la expresión de MHC-II en los macrófagos es también menor. Como consecuencia, los macrófagos son menos efectivos en la presentación antigénica, disminuyendo la activación de las células T e incrementando la tolerancia inmune (Cao et al., 2002; Sinha et al., 2007). Las MDSCs inducen también efectos supresores sobre las DCs que están presentes en el foco inflamatorio que en contacto con las primeras producen menos citoquinas IL-23 e IL-12, con lo cual no maduran y no funcionan como APCs (Sinha et al., 2007). Por tanto, la polarización que causan las MDSCs en el microambiente en el que están presentes favorece al desarrollo de un ambiente anti-inflamatorio que es beneficioso para la regulación de la respuesta autoinmune. En conjunto, el incremento en la apoptosis de la población de MDSCs en el modelo de EM afectaría al curso de la enfermedad debido a que los diferentes tipos celulares presentes en el foco inflamatorio dejarían de ser polarizados hacia un fenotipo anti-inflamatorio.

La administración del retinoide Am80 a los ratones con EAE no induce cambios significativos en el porcentaje de células CD11b⁺ en el bazo. En cambio en la médula espinal de estos ratones aumenta el porcentaje de estas células, principalmente debido al incremento de las células CD11b⁺ /Arg-1⁻ las cuales presentan una forma redondeada y un citoplasma sin apenas vacuolas, lo que sugiere que son células de origen mielóide de naturaleza macrofágica o dendrítica. Así mismo, Am80 induce un gran incremento en el

número de neutrófilos, tanto en el SNC como en el bazo, más intenso que el observado en las células CD11b⁺/Arg-1⁻ (Fig. 52).

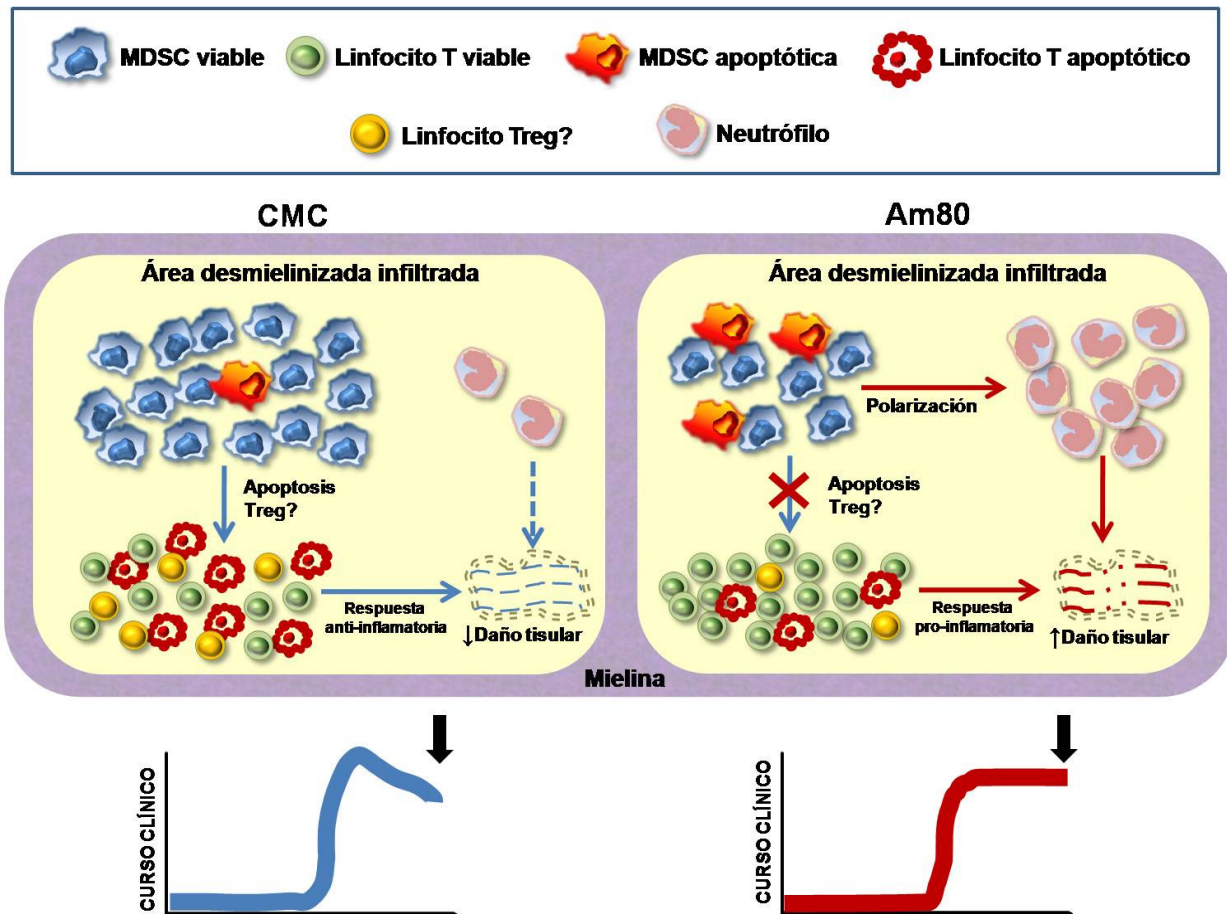


Figura 52: Las MDSCs son esenciales en la inmunosupresión de la respuesta autoinmune en la EAE.

El tratamiento con Am80 induce la polarización de las IMCs o MDSCs a neutrófilos, produciendo un gran incremento en el porcentaje de éstos y una disminución en el porcentaje de MDSCs en el interior del área desmielinizada infiltrada. Además, el tratamiento induce la apoptosis de las MDSCs presentes en el área desmielinizada infiltrada. Los cambios en la población de MDSCs afectarían a la respuesta inmunosupresora, incrementando el porcentaje de linfocitos T viables, disminuyendo el de apoptóticos y, quizás, disminuyendo la población de linfocitos Treg. Como consecuencia no se resuelve la respuesta pro-inflamatoria, el daño tisular es mayor y el curso clínico evoluciona sin signos evidentes de recuperación sintomatológica.

Diversos estudios muestran cómo el tratamiento con ácido retinoico reduce el porcentaje de IMCs en la médula ósea, en los nódulos linfáticos y en los bazos de los ratones con cáncer y, además, en esta última estructura reduce también el porcentaje de las MDSCs. Esta disminución de ambas poblaciones celulares es consecuencia de la polarización que sufren hacia macrófagos, DCs y granulocitos tras el tratamiento (Walkley et

al., 2002; Kusmartsev et al., 2003; Mirza et al., 2006; Nefedova et al., 2007). Todos estos datos sugieren que, en el modelo de EAE, el tratamiento con Am80 puede estar afectando a las IMCs en el compartimento hematopoyético y a las MDSCs generadas durante el desarrollo de la respuesta autoinmune, induciendo la polarización de estas células hacia un fenotipo mioelide maduro de macrófago, DC y/o, preferentemente en nuestro caso, de neutrófilo (Fig. 52). La polarización a neutrófilos puede deberse a la expresión de los receptores RAR en las IMCs o las MDSCs. De este modo, se ha observado que la sobreexpresión de los receptores RAR γ es necesario para el mantenimiento de las células hematopoyéticas, mientras que la sobreexpresión de los receptores RAR α favorece el desarrollo de los neutrófilos (Purton et al., 2006). Am80 es un fármaco de unión específica a los receptores RAR α (Takeda et al., 2006), lo que apoyaría que los ratones con EAE tratados con este fármaco presenten un incremento en la población de neutrófilos más marcado que el observado para la población de células CD11b⁺/Arg-1.

En cuanto a la población de linfocitos T y al igual que lo observado por otros autores (Klemann et al., 2009), Am80 no induce cambios en el porcentaje de linfocitos T CD3⁺ en el bazo de los ratones con EAE. Sin embargo, el fármaco incrementa el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y disminuye el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ tanto en el bazo como en la médula espinal, generando en esta última estructura un descenso significativo en el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ apoptóticos que hace desaparecer la correlación directa significativa entre la densidad de MDSCs y la de linfocitos T CD4⁺ apoptóticos (Fig. 52). Estudios en cáncer muestran que el descenso en la densidad de las IMCs mediante el tratamiento con ácido retinoico induce la acumulación de linfocitos T CD4⁺ antígeno-específicos en los ratones enfermos (Nefedova et al., 2007; Klemann et al., 2009). Por tanto, nuestros resultados en el modelo animal de EM indican que la eliminación de las MDSCs mediante el tratamiento con Am80 podría estar impidiendo la inmunosupresión que ejercen estas células sobre los linfocitos T CD4⁺, generando la acumulación de éstos últimos en el bazo y la médula espinal. Otro factor que puede estar afectando a la población de linfocitos T es el incremento observado en el número de macrófagos y/o DCs y de neutrófilos. En el modelo animal de

EM, tanto las DCs como los neutrófilos son un elemento clave durante la respuesta inmune de la EAE (Greter et al., 2005; Zozulya et al., 2010; Wu et al., 2010). De este modo, el incremento del número de DCs localizadas en las meninges aumenta la severidad sintomatológica de la EAE debido a que reactivan a las células T CD4⁺ específicas para MOG (Greter et al., 2005). Además, los neutrófilos son conocidos por su gran poder citotóxico sobre el tejido en el que se encuentran (Abbas, 2008). De hecho, un incremento de esta población celular en los animales con EAE es signo de una respuesta inmune más agresiva, que como consecuencia causa una degeneración axonal más intensa con importantes repercusiones morfofuncionales (Wu et al., 2010). Además, hay evidencias que sugieren que los neutrófilos participan en la respuesta pro-inflamatoria en cooperación con los linfocitos Th17 (Pelletier et al., 2010). Es más, cuando las MDSCs extraídas de un tumor en un periodo más avanzado de la enfermedad son tratadas con ATRA incrementa en ellas la capacidad de volver a funcionar como APCs (Lee et al., 2011). Según estos datos, el incremento en la densidad de las células CD11b⁺ sin expresión de Arg-I podría indicar un aumento de la población de DCs, que funcionarían como APCs en el tejido y producirían una mayor actividad de los linfocitos T CD4⁺, determinando un curso clínico más severo de la EAE. A todo esto debemos sumar, también, el gran incremento de neutrófilos que presentan los ratones con EAE, algo que tendría por tanto un efecto citotóxico en el tejido y, además, podrían estar cooperando con la población de linfocitos Th17, con lo que dificultaría la inmunosupresión de la respuesta autoinmune en estos animales.

En conclusión, la administración de Am80 justo antes de observar signos efectivos de inmunosupresión en los ratones con EAE y, además, su administración continuada durante un periodo lo suficientemente largo como para afectar a las MDSCs, podría inducir la apoptosis de estas células, así como su diferenciación a macrófagos y/o DCs y, mayoritariamente, hacia neutrófilos lo que, en su conjunto, impediría la inmunosupresión de la población de linfocitos T. Todos estos factores promueven que los ratones con EAE mantengan la respuesta autoinmune activa y no se observe en ellos una mejoría de los síntomas clínicos (Fig. 52).

III- Implicaciones terapéuticas de las Células Supresoras Derivadas de Mieloides como futuros agentes terapéuticos en la Esclerosis Múltiple

La respuesta autoinmune en la EM se produce debido a diversos errores en los mecanismos de auto-tolerancia y en los mecanismos de regulación que impiden alcanzar de nuevo la homeostasis inmune (Szczepanik, 2011; Gonsette, 2012). A lo largo de este trabajo mostramos en el modelo animal de EM la intervención activa de las MDSCs en el SNC de los ratones inmunizados. Las MDSCs inducen, al final del periodo de incremento de los síntomas clínicos, la apoptosis de los linfocitos T en el SNC, pudiendo también inducir la presencia o actividad de las células Treg (Huang et al., 2006; Serafini et al., 2006; Pan et al., 2008; Szczepanik, 2011). Por otro lado, mostramos que las MDSCs tienen una gran plasticidad y que su posible evolución hacia un fenotipo más patogénico en el momento en el que deben desencadenar la inmunosupresión de la respuesta autoinmune elimina la recuperación de los síntomas clínicos. En conjunto, las propiedades inmunosupresoras descritas en el modelo animal de EM convierten a las MDSCs en una posible nueva diana terapéutica endógena e innovadora para esta patología, ya que dichas células favorecen ambos mecanismos reguladores necesarios para alcanzar la homeostasis inmune: la inducción de las células Treg y la apoptosis de los linfocitos T autorreactivos. Pero, además de los mecanismos que afectan directamente a las células T CD4⁺ o CD8⁺, las MDSCs también pueden reprimir la respuesta inmune mediante su relación con otras células inmunes, como los macrófagos, NK y DCs (Ostrand-Rosenberg y Sinha, 2009). Además, diversos estudios muestran los beneficios neuroprotectores que ejerce la enzima Arg-I en el SNC, ya que participa en la producción de poliaminas y disminuye la producción de ON (Lange et al., 2004; Estévez et al., 2006).

Sin embargo, la mayoría de los estudios previos en EAE examinan las MDSCs de forma independiente, generando una información incompleta en cuanto a su función, sin tener en cuenta su gran plasticidad funcional y la variedad de sus interacciones con otras poblaciones celulares (Estévez et al., 2006; Gabilovich et al., 2012). Con lo cual, los

resultados obtenidos son a veces contradictorios e incitan a dudar del poder beneficioso de las MDSCs en la EM: King et al. (2009), muestran que las IMCs según el ambiente inflamatorio en el que se encuentren, pueden tener un papel patogénico y/o inmunosupresor durante el curso de la EAE. Por otro lado, la transferencia de MDSCs activadas (con GM-CSF, LPS e IFN γ) en el momento de inicio de los primeros síntomas clínicos de la EAE, reduce la severidad de la enfermedad de manera más intensa que si son transferidas sin activar (Zhu et al., 2011; Slaney et al., 2011). En cambio, el uso de factores de crecimiento *in vitro* también puede inducir la maduración de las MDSCs a macrófagos y DCs, con efectos claramente patogénicos (Corzo et al., 2010). Incluso *in vivo*, en el trasplante autólogo de células precursoras hematopoyéticas a enfermos de EM, los pacientes tienen el riesgo de padecer un brote cuando se realiza la movilización a la sangre de estas células mediante GM-CSF y deben ser tratados con corticoides, quizás debido a que las MDSCs estén madurando con el procedimiento (Openshaw et al., 2000; Nash et al., 2003). Por tanto, para que las MDSCs pudieran considerarse una terapia efectiva y segura, deben mantener su fenotipo inmaduro y supresor. Para ello, es esencial abordar el estudio de esta población celular en los pacientes con EM en el curso de la enfermedad y, además, durante la administración al paciente del tratamiento inmunomodulador. De este modo, se podría conocer qué terapias inmunomoduladoras aceptadas hoy día para el tratamiento de la EM promueven o no a las MDSCs y si dichas terapias son más o menos efectivas dependiendo de si actúan o no sobre las MDSCs. Un estudio reciente en ratones con EAE muestra que el tratamiento con acetato de glatirámico por vía intravenosa se une a las MDSCs y promueve que estas células reduzcan la proliferación de los linfocitos T, generando un curso clínico de la enfermedad menos severo (Toker et al., 2011). Sin embargo, en la actualidad no apenas estudios que examinen a las MDSCs en los pacientes con EM (Ioannou et al., 2012).

Pero, además del uso de un agente terapéutico que las promueva, el empleo de las MDSCs como terapia celular mediante su transferencia podría ser también una novedosa estrategia terapéutica en EM. De este modo, la transferencia de las MDSCs junto la combinación de una terapia farmacológica que induzca y/o mantenga las propiedades

inmunosupresoras de estas células mejoraría la tolerancia periférica en los pacientes. La vía de transferencia de las MDSCs empleada actualmente en el modelo animal de EM es la vía intravenosa (Slaney et al., 2010; Zhu et al., 2011), pero habría que tener en cuenta que este abordaje quizás impida su llegada al SNC en el estado inmaduro necesario para ejercer su papel supresor. Por lo tanto, la transferencia de las MDSCs por vía intratecal o epidural aseguraría la llegada temprana al SNC y, probablemente, en el estado de inmadurez adecuado para que realicen más efectiva y rápidamente la regulación de la respuesta autoinmune. A esta técnica podría sumarse el uso de un agente que asegure sus funciones inmunomoduladoras activas, como por ejemplo la IL-4, IL necesaria *in vitro* para que las MDSCs expresen Arg-I (Bronte y Zanovello, 2005), o junto a algún fármaco que las potencie y que acelere, además, la inmunomodulación de la respuesta pro-inflamatoria (Toker et al., 2011).

En el modelo de EAE, la capacidad inmunomoduladora de las MDSCs sobre los linfocitos T en el foco inflamatorio sugiere que el uso de esta terapia en humanos se realice en pacientes con un curso de EM-RR temprana, ya que en estos pacientes predomina el componente inflamatorio y la neurodegeneración es, en líneas generales todavía leve (Frohman et al., 2006). La supresión de la respuesta autoinmune en estos pacientes reduciría la inflamación del SNC generada durante el periodo del brote, disminuyendo así la posterior degeneración nerviosa secundaria. Al igual que el trasplante de precursores hematopoyéticos, la transferencia de MDSCs podría realizarse de manera autóloga, obteniendo las propias MDSCs del paciente pero inyectándolas posteriormente por vía epidural, en vez de utilizar la intravenosa, como se realiza normalmente con el trasplante de precursores hematopoyéticos. En cuanto a la obtención de las MDSCs, habría dos posibles fuentes: la sangre circulante (por aféresis) o a través de la médula ósea del paciente. Por tanto, es esencial realizar un estudio exhaustivo de la población de MDSCs en los pacientes con EM, ya que estas células podrían aportar grandes beneficios terapéuticos a estos pacientes.

CONCLUSIONES

1. Las células Arg-I⁺ no están presentes en la médula espinal de los ratones *sham* o control. Sin embargo, dichas células sí están presentes en la médula espinal de los ratones con EAE y estas células se localizan, exclusivamente, en el área infiltrada desmielinizada.
2. Las células Arg-I⁺ muestran una distribución temporal transitoria durante el curso clínico de la EAE: son abundantes al final del periodo de incremento de los síntomas clínicos, mucho menos numerosas al final del periodo de recuperación parcial de los síntomas clínicos y desaparecen por completo durante el inicio y final del periodo crónico de la EAE.
3. Las células Arg-I⁺ presentan un fenotipo CD11b⁺/Gr-1⁺/CD115⁺/Ly6B.2⁻, lo que las identifica como MDSCs de estirpe monocítica con propiedades altamente supresoras. Así mismo, la gran mayoría de las MDSCs muestran inmunomarcaje para la enzima iNOS, lo que indica que dichas células están participando activamente en la inmunosupresión de los linfocitos T mediante la actividad de ambas enzimas.
4. El alto porcentaje de MDSCs en contacto directo con los linfocitos T apoptóticos en la médula espinal de los ratones con EAE muestra por primera vez *in vivo* que, al igual que en otros estudios *in vitro*, las MDSCs necesitan estar en contacto celular directo con los linfocitos T para inducir la apoptosis de estos últimos. Por otro lado, queda demostrado, tanto *in vivo* como *in vitro* que, al final del periodo de incremento de los síntomas clínicos, las MDSCs en la médula espinal tienen la capacidad de inducir un aumento significativo en el número de linfocitos T apoptóticos.
5. La administración de Am80 a los ratones con EAE antes de observar en ellos signos efectivos de inmunosupresión elimina la transición a la fase de recuperación parcial de los síntomas clínicos, lo que conlleva la cronificación de la discapacidad.

6. La administración de Am80 a los ratones con EAE induce, tanto a nivel periférico (en el bazo) como en la médula espinal, una disminución en el número de MDSCs y un incremento en el número de neutrófilos. Así mismo, el fármaco induce un aumento del número total de células mieloides y un incremento significativo del número de MDSCs apoptóticas. Por tanto, el tratamiento está induciendo la apoptosis de las MDSCs y, además, está polarizando a las células mieloides inmaduras, o directamente a las MDSCs, hacia un fenotipo más maduro. Esto explicaría, entre otros factores, el incremento observado en el número de linfocitos T CD4⁺, tanto en el bazo como en la médula espinal de los ratones con EAE tratados. De este modo, la administración de Am80 impide que las MDSCs jueguen su papel inmunosupresor sobre los linfocitos T, por lo que no se observa la recuperación parcial de los síntomas clínicos característica de este modelo animal de EM.
7. Los resultados expuestos en este trabajo indican que las MDSCs ejercen un papel fundamental en la inmunosupresión de la respuesta autoinmune en la EA farmacológica de las MDSCs aisladas de pacientes de Esclerosis Múltiple, bien activándolas o bien manteniéndolas en condiciones óptimas de inmunosupresión, podría ser la base de una novedosa terapia celular para el tratamiento de esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas AK, Lohr J, Knoechel B, Nagabhushanam V (2004) T cell tolerance and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 3:471-475.

Abbas AK, Lichtman AH, Pallai S (2008) *Cellular and molecular immunology*. Ed Elsevier

Adeegbe D, Serafini P, Bronte V, Zoso A, Ricordi C, Inverardi L (2011) In vivo induction of myeloid suppressor cells and CD4(+)Foxp3(+) T regulatory cells prolongs skin allograft survival in mice. *Cell Transplant* 20:941-954.

Airas L, Saraste M, Rinta S, Elovaara I, Huang YH, Wiendl H (2008) Immunoregulatory factors in multiple sclerosis patients during and after pregnancy: relevance of natural killer cells. *Clin Exp Immunol* 151:235-243.

Albert ML (2004) Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation? *Nat Rev Immunol* 4:223-231.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357:593-615.

Almand B, Clark JI, Nikitina E, van BJ, English NR, Knight SC, Carbone DP, Gabrilovich DI (2001) Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* 166:678-689.

Alonso A, Hernan MA (2008) Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology* 71:129-135.

Apolloni E, Bronte V, Mazzoni A, Serafini P, Cabrelle A, Segal DM, Young HA, Zanovello P (2000) Immortalized myeloid suppressor cells trigger apoptosis in antigen-activated T lymphocytes. *J Immunol* 165:6723-6730.

Aranami T, Yamamura T (2008) Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergol Int* 57:115-120.

Astier AL, Meiffren G, Freeman S, Hafler DA (2006) Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest* 116:3252-3257.

Aulak KS, Miyagi M, Yan L, West KA, Massillon D, Crabb JW, Stuehr DJ (2001) Proteomic method identifies proteins nitrated in vivo during inflammatory challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12056-12061.

Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schroder R, Deckert M, Schmidt S, Ravid R, Rajewsky K (2000) Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 192:393-404.

Bailey SL, Schreiner B, McMahon EJ, Miller SD (2007) CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4+ T(H)-17 cells in relapsing EAE. *Nat Immunol* 8:172-180.

Baniyash M (2004) TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat Rev Immunol* 4:675-687.

Batoulis H, Addicks K, Kuerten S (2010) Emerging concepts in autoimmune encephalomyelitis beyond the CD4/T(H)1 paradigm. *Ann Anat* 192:179-193.

- Batoulis H, Recks MS, Addicks K, Kuerten S (2011) Experimental autoimmune encephalomyelitis--achievements and prospective advances. *APMIS* 119:819-830.
- Bauer J, Bradl M, Hickley WF, Forss-Petter S, Breitschopf H, Linington C, Wekerle H, Lassmann H (1998) T-cell apoptosis in inflammatory brain lesions: destruction of T cells does not depend on antigen recognition. *Am J Pathol* 153:715-724.
- Becher B, Durell BG, Noelle RJ (2002) Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J Clin Invest* 110:493-497.
- Belmadani A, Tran PB, Ren D, Miller RJ (2006) Chemokines regulate the migration of neural progenitors to sites of neuroinflammation. *J Neurosci* 26:3182-3191.
- Berard JL, Wolak K, Fournier S, David S (2010) Characterization of relapsing-remitting and chronic forms of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Glia* 58:434-445.
- Bingisser RM, Tilbrook PA, Holt PG, Kees UR (1998) Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *J Immunol* 160:5729-5734.
- Bogdan C (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2:907-916.
- Boros P, Ochando JC, Chen SH, Bromberg JS (2010) Myeloid-derived suppressor cells: natural regulators for transplant tolerance. *Hum Immunol* 71:1061-1066.
- Bronte V, Apolloni E, Cabrelle A, Ronca R, Serafini P, Zamboni P, Restifo NP, Zanovello P (2000) Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood* 96:3838-3846.
- Bronte V, Serafini P, De Santo C (2003a) IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* 170:270-278.
- Bronte V, Serafini P, Mazzoni A (2003b) L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends Immunol* 24:302-306.
- Bronte V, Zanovello P (2005) Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* 5:641-654.
- Buessow SC, Paul RD, Lopez DM (1984) Influence of mammary tumor progression on phenotype and function of spleen and in situ lymphocytes in mice. *J Natl Cancer Inst* 73:249-255.
- Bunt SK, Yang L, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S (2007) Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer Res* 67:10019-10026.
- Cao S, Liu J, Chesi M, Bergsagel PL, Ho IC, Donnelly RP, Ma X (2002) Differential regulation of IL-12 and IL-10 gene expression in macrophages by the basic leucine zipper transcription factor c-Maf fibrosarcoma. *J Immunol* 169:5715-5725.
- Carmody RJ, Hilliard B, Maguschak K, Chodosh LA, Chen YH (2002) Genomic scale profiling of autoimmune inflammation in the central nervous system: the nervous response to inflammation. *J Neuroimmunol* 133:95-107.

Cassan C, Liblau RS (2007) Immune tolerance and control of CNS autoimmunity: from animal models to MS patients. *J Neurochem* 100:883-892.

Chen ML, Yan BS, Kozoriz D, Weiner HL (2009) Novel CD8(+) Treg suppress EAE by TGF-beta- and IFN-gamma-dependent mechanisms. *Eur J Immunol*.

Chen W, Frank ME, Jin W, Wahl SM (2001) TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity* 14:715-725.

Chen Z, Guidez F, Rousselot P, Agadir A, Chen SJ, Wang ZY, Degos L, Zelent A, Waxman S, Chomienne C (1994) PLZF-RAR alpha fusion proteins generated from the variant t(11;17)(q23;q21) translocation in acute promyelocytic leukemia inhibit ligand-dependent transactivation of wild-type retinoic acid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1178-1182.

Clemente D, Ortega MC, Arenzana FJ, De Castro F (2011) FGF-2 and Anosmin-1 are selectively expressed in different types of multiple sclerosis lesions. *J Neurosci* 31:14899-14909.

Compston A, Coles A (2008) Multiple sclerosis. *Lancet* 372:1502-1517.

Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B (2011) Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol* 164:1079-1106.

Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22:633-640.

Cornic M, Agadir A, Degos L, Chomienne C (1994a) Retinoids and differentiation treatment: a strategy for treatment in cancer. *Anticancer Res* 14:2339-2346.

Cornic M, Delva L, Castaigne S, Lefebvre P, Balitrand N, Degos L, Chomienne C (1994b) In vitro all-trans retinoic acid (ATRA) sensitivity and cellular retinoic acid binding protein (CRABP) levels in relapse leukemic cells after remission induction by ATRA in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 8:914-917.

Corzo CA, Condamine T, Lu L, Cotter MJ, Youn JI, Cheng P, Cho HI, Celis E, Quiceno DG, Padhya T, McCaffrey TV, McCaffrey JC, Gabilovich DI (2010) HIF-1alpha regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Exp Med* 207:2439-2453.

Cuenca AG, Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, Moreno C, Scumpia PO, Laface DM, Heyworth PG, Efron PA, Moldawer LL (2011) A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma. *Mol Med* 17:281-292.

Dardalhon V, Anderson AC, Karman J, Apetoh L, Chandwaskar R, Lee DH, Cornejo M, Nishi N, Yamauchi A, Quintana FJ, Sobel RA, Hirashima M, Kuchroo VK (2010) Tim-3/galectin-9 pathway: regulation of Th1 immunity through promotion of CD11b+Ly-6G+ myeloid cells. *J Immunol* 185:1383-1392.

Dawson HD, Collins G, Pyle R, Key M, Taub DD (2008) The Retinoic Acid Receptor-alpha mediates human T-cell activation and Th2 cytokine and chemokine production. *BMC Immunol* 9:16.

- De AK, Kodys KM, Pellegrini J, Yeh B, Furse RK, Bankey P, Miller-Graziano CL (2000) Induction of global anergy rather than inhibitory Th2 lymphokines mediates posttrauma T cell immunodepression. *Clin Immunol* 96:52-66.
- De AC (2003) [The interest of multiple sclerosis attacks. Physiopathology and therapy]. *Rev Neurol* 36:1058-1064.
- Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS (2007) MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med* 204:1463-1474.
- Dent LA (2002) For better or worse: common determinants influencing health and disease in parasitic infections, asthma and reproductive biology. *J Reprod Immunol* 57:255-272.
- Deshpande P, King IL, Segal BM (2007) Cutting edge: CNS CD11c+ cells from mice with encephalomyelitis polarize Th17 cells and support CD25+CD4+ T cell-mediated immunosuppression, suggesting dual roles in the disease process. *J Immunol* 178:6695-6699.
- Dillon S, Agrawal S, Banerjee K, Letterio J, Denning TL, Oswald-Richter K, Kasprovicz DJ, Kellar K, Pare J, van DT, Ziegler S, Unutmaz D, Pulendran B (2006) Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J Clin Invest* 116:916-928.
- Dugast AS, Haudebourg T, Coulon F, Heslan M, Haspot F, Poirier N, Vuillefroy de SR, Usal C, Smit H, Martinet B, Thebault P, Renaudin K, Vanhove B (2008) Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *J Immunol* 180:7898-7906.
- Duhe RJ, Evans GA, Erwin RA, Kirken RA, Cox GW, Farrar WL (1998) Nitric oxide and thiol redox regulation of Janus kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:126-131.
- Dumitru CA, Moses K, Trellakis S, Lang S, Brandau S (2012) Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer Immunol Immunother* 61:1155-1167.
- Durelli L, Conti L, Clerico M, Boselli D, Contessa G, Ripellino P, Ferrero B, Eid P, Novelli F (2009) T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Ann Neurol* 65:499-509.
- Elkabets M, Ribeiro VS, Dinarello CA, Ostrand-Rosenberg S, Di Santo JP, Apte RN, Vosshenrich CA (2010) IL-1beta regulates a novel myeloid-derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function. *Eur J Immunol* 40:3347-3357.
- Engedal N, Auberger P, Blomhoff HK (2009) Retinoic acid regulates Fas-induced apoptosis in Jurkat T cells: reversal of mitogen-mediated repression of Fas DISC assembly. *J Leukoc Biol* 85:469-480.
- Estévez AG, Sahawneh MA, Lange PS, Bae N, Egea M, Ratan RR (2006) Arginase 1 regulation of nitric oxide production is key to survival of trophic factor-deprived motor neurons. *J Neurosci* 26:8512-8516.
- Evans TR, Kaye SB (1999) Retinoids: present role and future potential. *Br J Cancer* 80:1-8.

Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101:890-898.

Fillatreau S, Sweenie CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM (2002) B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* 3:944-950.

Fischer TA, Palmetshofer A, Gambaryan S, Butt E, Jassoy C, Walter U, Sopper S, Lohmann SM (2001) Activation of cGMP-dependent protein kinase Ibeta inhibits interleukin 2 release and proliferation of T cell receptor-stimulated human peripheral T cells. *J Biol Chem* 276:5967-5974.

Fitzgerald DC, Zhang GX, El-Behi M, Fonseca-Kelly Z, Li H, Yu S, Saris CJ, Gran B, Ciric B, Rostami A (2007) Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. *Nat Immunol* 8:1372-1379.

Frohman EM, Racke MK, Raine CS (2006) Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 354:942-955.

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

Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V (2012) Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 12:253-268.

Gabrilovich DI, Velders MP, Sotomayor EM, Kast WM (2001) Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *J Immunol* 166:5398-5406.

Gallina G, Dolcetti L, Serafini P, De SC, Marigo I, Colombo MP, Basso G, Brombacher F, Borrello I, Zanovello P, Biccato S, Bronte V (2006) Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *J Clin Invest* 116:2777-2790.

Garcia MR, Ledgerwood L, Yang Y, Xu J, Lal G, Burrell B, Ma G, Hashimoto D, Li Y, Boros P, Grisotto M, van Rooijen N, Matesanz R, Tacke F, Ginhoux F, Ding Y, Chen SH, Randolph G, Merad M, Bromberg JS, Ochando JC (2010) Monocytic suppressive cells mediate cardiovascular transplantation tolerance in mice. *J Clin Invest* 120:2486-2496.

Gimeno R, Barquinero J (2011) Myeloid-derived suppressor cells (MDSC): Another player in the orchestra. *Inmunología* 30(2):45-53

Gold R, Lington C, Lassmann H (2006) Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129:1953-1971.

Goñi O, Alcaide P, Fresno M (2002) Immunosuppression during acute *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of Ly6G Gr1(+)CD11b(+) immature myeloid suppressor cells. *Int Immunol* 14:1125-1134.

Gonsette RE (2012) Self-tolerance in multiple sclerosis. *Acta Neurol Belg* 112:133-140.

Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3:23-35.

Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5:953-964.

- Gourraud PA, Harbo HF, Hauser SL, Baranzini SE (2012) The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunol Rev* 248:87-103.
- Goverman J (2009) Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 9:393-407.
- Goverman JM (2011) Immune tolerance in multiple sclerosis. *Immunol Rev* 241:228-240.
- Greter M, Heppner FL, Lemos MP, Odermatt BM, Goebels N, Laufer T, Noelle RJ, Becher B (2005) Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat Med* 11:328-334.
- Groux H (2001) An overview of regulatory T cells. *Microbes Infect* 3:883-889.
- Gutcher I, Becher B (2007) APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J Clin Invest* 117:1119-1127.
- Harris MG, Fabry Z (2012) Initiation and Regulation of CNS Autoimmunity: Balancing Immune Surveillance and Inflammation in the CNS. *Neuroscience and Medicine* 3: 203-224.
- Heath WR, Carbone FR (2001) Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 19:47-64.
- Heeger PS, Valujskikh A, Lehmann PV (2000) Comprehensive assessment of determinant specificity, frequency, and cytokine signature of the primed CD8 cell repertoire induced by a minor transplantation antigen. *J Immunol* 165:1278-1284.
- Hestdal K, Ruscetti FW, Ihle JN, Jacobsen SE, Dubois CM, Kopp WC, Longo DL, Keller JR (1991) Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J Immunol* 147:22-28.
- Hickey WF, Hsu BL, Kimura H (1991) T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* 28:254-260.
- Highfill SL, Rodriguez PC, Zhou Q, Goetz CA, Koehn BH, Veenstra R, Taylor PA, Panoskaltis-Mortari A, Serody JS, Munn DH, Tolar J, Ochoa AC, Blazar BR (2010) Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. *Blood* 116:5738-5747.
- Hildeman DA, Mitchell T, Aronow B, Wojciechowski S, Kappler J, Marrack P (2003a) Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15035-15040.
- Hildeman DA, Mitchell T, Kappler J, Marrack P (2003b) T cell apoptosis and reactive oxygen species. *J Clin Invest* 111:575-581.
- Hofstetter HH, Grau C, Buttmann M, Forsthuber TG, Gaupp S, Toyka KV, Gold R (2007) The PLPp-specific T-cell population promoted by pertussis toxin is characterized by high frequencies of IL-17-producing cells. *Cytokine* 40:35-43.
- Hofstetter HH, Shive CL, Forsthuber TG (2002) Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells. *J Immunol* 169:117-125.

Hotchkiss RS, Tinsley KW, Karl IE (2003) Role of apoptotic cell death in sepsis. *Scand J Infect Dis* 35:585-592.

Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmieg RE Jr., Hui JJ, Chang KC, Osborne DF, Freeman BD, Cobb JP, Buchman TG, Karl IE (2001) Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4⁺ T lymphocytes in humans. *J Immunol* 166:6952-6963.

Huan J, Culbertson N, Spencer L, Bartholomew R, Burrows GG, Chou YK, Bourdette D, Ziegler SF, Offner H, Vandenbark AA (2005) Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *J Neurosci Res* 81:45-52.

Huang B, Pan PY, Li Q (2006) Gr-1⁺CD115⁺ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res* 66:1123-1131.

Ichihara F, Kono K, Sekikawa T, Matsumoto Y (1999) Surgical stress induces decreased expression of signal-transducing zeta molecules in T cells. *Eur Surg Res* 31:138-146.

Inglese M (2006) Multiple sclerosis: new insights and trends. *AJNR Am J Neuroradiol* 27:954-957.

Ioannou M, Alissafi T, Lazaridis I, Deraos G, Matsoukas J, Gravanis A, Mastorodemos V, Plaitakis A, Sharpe A, Boumpas D, Verginis P (2012) Crucial role of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in the regulation of central nervous system autoimmune disease. *J Immunol* 188: 1136-1146.

Jilek S, Schluep M, Rossetti AO, Guignard L, Le GG, Pantaleo G, Du Pasquier RA (2007) CSF enrichment of highly differentiated CD8⁺ T cells in early multiple sclerosis. *Clin Immunol* 123:105-113.

Jimi S, Mashima K, Matsumoto T, Hara S, Suzumiya J, Tamura K (2007) RAR α is a regulatory factor for Am-80-induced cell growth inhibition of hematologic malignant cells. *Int J Oncol* 31:397-404.

Junker A, Ivanidze J, Malotka J, Eiglmeier I, Lassmann H, Wekerle H, Meinl E, Hohlfeld R, Dornmair K (2007) Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain* 130:2789-2799.

Kagechika H, Kawachi E, Hashimoto Y, Himi T, Shudo K (1988) Retinobenzoic acids. 1. Structure-activity relationships of aromatic amides with retinoidal activity. *J Med Chem* 31:2182-2192.

Kang BY, Chung SW, Kim SH, Kang SN, Choe YK, Kim TS (2000) Retinoid-mediated inhibition of interleukin-12 production in mouse macrophages suppresses Th1 cytokine profile in CD4⁽⁺⁾ T cells. *Br J Pharmacol* 130:581-586.

King IL, Dickendesher TL, Segal BM (2009) Circulating Ly-6C⁺ myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. *Blood* 113:3190-3197.

Kirk S, Frank JA, Karlik S (2004) Angiogenesis in multiple sclerosis: is it good, bad or an epiphenomenon? *J Neurol Sci* 217:125-130.

- Klemann C, Raveney BJ, Klemann AK, Ozawa T, von HS, Shudo K, Oki S, Yamamura T (2009) Synthetic retinoid AM80 inhibits Th17 cells and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* 174:2234-2245.
- Korn T, Anderson AC, Bettelli E, Oukka M (2007) The dynamics of effector T cells and Foxp3⁺ regulatory T cells in the promotion and regulation of autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 191:51-60.
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK (2009) IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 27:485-517.
- Krumbholz M, Derfuss T, Hohlfeld R, Meinl E (2012) B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurol* 8:613-623.
- Kuchroo VK, Anderson AC, Waldner H, Munder M, Bettelli E, Nicholson LB (2002) T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the autopathogenic T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* 20:101-123.
- Kusmartsev S, Cheng F, Yu B, Nefedova Y, Sotomayor E, Lush R, Gabrilovich D (2003) All-trans-retinoic acid eliminates immature myeloid cells from tumor-bearing mice and improves the effect of vaccination. *Cancer Res* 63:4441-4449.
- Kusmartsev S, Gabrilovich DI (2003) Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species. *J Leukoc Biol* 74:186-196.
- Kusmartsev S, Nefedova Y, Yoder D, Gabrilovich DI (2004) Antigen-specific inhibition of CD8⁺ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J Immunol* 172:989-999.
- Kusmartsev SA, Li Y, Chen SH (2000) Gr-1⁺ myeloid cells derived from tumor-bearing mice inhibit primary T cell activation induced through CD3/CD28 costimulation. *J Immunol* 165:779-785.
- Kuwata T, Wang IM, Tamura T, Ponnamperna RM, Levine R, Holmes KL, Morse HC, De Luca LM, Ozato K (2000) Vitamin A deficiency in mice causes a systemic expansion of myeloid cells. *Blood* 95:3349-3356.
- Labrecque J, Allan D, Chambon P, Iscove NN, Lohnes D, Hoang T (1998) Impaired granulocytic differentiation in vitro in hematopoietic cells lacking retinoic acid receptors alpha1 and gamma. *Blood* 92:607-615.
- Lange PS, Langley B, Lu P, Ratan RR (2004) Novel roles for arginase in cell survival, regeneration, and translation in the central nervous system. *J Nutr* 134:2812S-2817S.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201:233-240.
- Lee J, Ryu H, Ferrante RJ (2003) Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4843-4848.

- Lee JM, Seo JH, Kim YJ, Kim YS, Ko HJ, Kang CY (2011) The restoration of myeloid-derived suppressor cells as functional antigen-presenting cells by NKT cell help and all-trans-retinoic acid treatment. *Int J Cancer*.
- Li A, Ojogho O, Escher A (2006) Saving death: apoptosis for intervention in transplantation and autoimmunity. *Clin Dev Immunol* 13:273-282.
- Li H, Han Y, Guo Q, Zhang M, Cao X (2009) Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol* 182:240-249.
- Li H, Zhang GX, Chen Y, Xu H, Fitzgerald DC, Zhao Z, Rostami A (2008) CD11c⁺CD11b⁺ dendritic cells play an important role in intravenous tolerance and the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 181:2483-2493.
- Libbey JE, Tsunoda I, Fujinami RS (2010) Studies in the modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmune Pharmacol* 5:168-175.
- Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L (2002) Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 8:500-508.
- Lockshin RA, Williams CM (1965) Programmed cell Death-I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkworm. *J Insect Physiol* 11:123-133.
- Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47:707-717.
- Macphail SE, Gibney CA, Brooks BM, Booth CG, Flanagan BF, Coleman JW (2003) Nitric oxide regulation of human peripheral blood mononuclear cells: critical time dependence and selectivity for cytokine versus chemokine expression. *J Immunol* 171:4809-4815.
- Makarenkova VP, Bansal V, Matta BM (2006) CD11b⁺/Gr-1⁺ myeloid suppressor cells cause T cell dysfunction after traumatic stress. *J Immunol* 176:2085-2094.
- Mann MK, Maresz K, Shriver LP, Tan Y, Dittel BN (2007) B cell regulation of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 178:3447-3456.
- Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Gow AJ, Stamler JS (1999) Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* 284:651-654.
- Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P (2006) Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46: 451-80.
- Martínez-Forero I, García-Muñoz R, Martínez-Pasamar S, Inoges S, López-Díaz de CA, Palacios R, Sepulcre J, Moreno B, González Z, Fernández-Díez B, Melero I, Bendandi M, Villoslada P (2008) IL-10 suppressor activity and ex vivo Tr1 cell function are impaired in multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 38:576-586.

- Matsushita T, Horikawa M, Iwata Y, Tedder TF (2010) Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis. *J Immunol* 185:2240-2252.
- Matusevicius D, Kivisakk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S, Link H (1999) Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler* 5:101-104.
- McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, Laurence A, Joyce-Shaikh B, Blumenschein WM, McClanahan TK, O'Shea JJ, Cua DJ (2009) The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol* 10:314-324.
- McGeachy MJ, Stephens LA, Anderton SM (2005) Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4⁺CD25⁺ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol* 175:3025-3032.
- Mikita J, Dubourdieu-Cassagno N, Deloire MS, Vekris A, Biran M, Raffard G, Brochet B, Canron MH, Franconi JM, Boiziau C, Petry KG (2011) Altered M1/M2 activation patterns of monocytes in severe relapsing experimental rat model of multiple sclerosis. Amelioration of clinical status by M2 activated monocyte administration. *Mult Scler* 17:2-15.
- Mirza N, Fishman M, Fricke I, Dunn M, Neuger AM, Frost TJ, Lush RM, Antonia S, Gabrilovich DI (2006) All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients. *Cancer Res* 66:9299-9307.
- Miwako I, Kagechika H (2007) Tamibarotene. *Drugs Today (Barc)* 43:563-568.
- Moliné-Velázquez V, Cuervo H, Vila-del Sol V, Ortega MC, Clemente D, de Castro F (2011) Myeloid-Derived Suppressor Cells Limit the Inflammation by Promoting T Lymphocyte Apoptosis in the Spinal Cord of a Murine Model of Multiple Sclerosis. *Brain Pathology* 21: 678-691.
- Moreno B, Espejo C, Mestre L, Suardiaz M, Clemente D, De Castro F, Fernández-Fernández O, Montalban X, Villoslada P, Guaza C (2012) Guía de uso adecuado de modelos animales para el desarrollo de terapias en esclerosis múltiple. *Rev Neurol* 54: 114-24.
- Movahedi K, Williams M, Van den BJ, Van den BR, Gysemans C, Beschin A, De BP, Van Ginderachter JA (2008) Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* 111: 4233-4244.
- Munder M, Schneider H, Luckner C (2006) Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase. *Blood* 108:1627-1634.
- Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE (2008) The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 8:618-631.
- Naegele M, Tillack K, Reinhardt S, Schippling S, Martin R, Sospedra M (2012) Neutrophils in multiple sclerosis are characterized by a primed phenotype. *J Neuroimmunol* 242:60-71.
- Najafian N, Chitnis T, Salama AD, Zhu B, Benou C, Yuan X, Clarkson MR, Sayegh MH, Khoury SJ (2003) Regulatory functions of CD8⁺. *J Clin Invest* 112:1037-1048.

Napoli JL (1986) Quantification of physiological levels of retinoic acid. *Methods Enzymol* 123:112-124.

Nash RA, Bowen JD, McSweeney PA, Pavletic SZ, Maravilla KR, Park MS, Storek J, Sullivan KM, Al-Omaishi J, Corboy JR, DiPersio J, Georges GE, Gooley TA, Holmberg LA, LeMaistre CF, Ryan K, Openshaw H, Sunderhaus J, Storb R, Zunt J, Kraft GH (2003) High-dose immunosuppressive therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation for severe multiple sclerosis. *Blood* 102:2364-2372.

Nefedova Y, Fishman M, Sherman S, Wang X, Beg AA, Gabrilovich DI (2007) Mechanism of all-trans retinoic acid effect on tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 67:11021-11028.

Nelson AL, Bieber AJ, Rodriguez M (2004) Contrasting murine models of MS. *Int MS J* 11:95-99.

Nishimori H, Maeda Y, Teshima T, Sugiyama H, Kobayashi K, Yamasuji Y, Kadohisa S, Uryu H, Takeuchi K, Tanaka T, Yoshino T, Iwakura Y, Tanimoto M (2012) Synthetic retinoid Am80 ameliorates chronic graft-versus-host disease by down-regulating Th1 and Th17. *Blood* 119:285-295.

Ochoa AC, Zea AH, Hernández C, Rodríguez PC (2007) Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 13:721s-726s.

Ochoa JB, Bernard AC, O'Brien WE, Griffen MM, Maley ME, Rockich AK, Tsuei BJ, Boulanger BR, Kearney PA, Morris JS (2001a) Arginase I expression and activity in human mononuclear cells after injury. *Ann Surg* 233:393-399.

Ochoa JB, Strange J, Kearney P, Gellin G, Endean E, Fitzpatrick E (2001b) Effects of L-arginine on the proliferation of T lymphocyte subpopulations. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 25:23-29.

Ohmori K, Hong Y, Fujiwara M, Matsumoto Y (1992) In situ demonstration of proliferating cells in the rat central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. Evidence suggesting that most infiltrating T cells do not proliferate in the target organ. *Lab Invest* 66:54-62.

Ohnishi K (2007) PML-RARalpha inhibitors (ATRA, tamibaroten, arsenic trioxide) for acute promyelocytic leukemia. *Int J Clin Oncol* 12:313-317.

Openshaw H, Stuve O, Antel JP, Nash R, Lund BT, Weiner LP, Kashyap A, McSweeney P, Forman S (2000) Multiple sclerosis flares associated with recombinant granulocyte colony-stimulating factor. *Neurology* 54:2147-2150.

Oreja-Guevara C, Ramos-Cejudo J, Aroeira LS, Chamorro B, Díez-Tejedor E (2012) Th1/Th2 Cytokine profile in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with Glatiramer acetate or Natalizumab. *BMC Neurol* 12:95.

Ostrand-Rosenberg S, Sinha P, Beury DW, Clements V (2012) Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression. *Seminars in Cancer Biology* 22:275-281.

Otsuji M, Kimura Y, Aoe T, Okamoto Y, Saito T (1996) Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3 zeta chain of T-cell receptor complex and antigen-specific T-cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13119-13124.

- Pan PY, Ozao J, Zhou Z (2008) Advancements in immune tolerance. *Adv Drug Deliv Rev* 60:91-105.
- Pelletier M, Micheletti A, Cassatella MA (2010) Modulation of human neutrophil survival and antigen expression by activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Leukoc Biol* 88:1163-1170.
- Pender MP (1998) Genetically determined failure of activation-induced apoptosis of autoreactive T cells as a cause of multiple sclerosis. *Lancet* 351:978-981.
- Pender MP, Csurhes PA, Greer JM, Mowat PD, Henderson RD, Cameron KD, Purdie DM, McCombe PA, Good MF (2000) Surges of increased T cell reactivity to an encephalitogenic region of myelin proteolipid protein occur more often in patients with multiple sclerosis than in healthy subjects. *J Immunol* 165:5322-5331.
- Pender MP, McCombe PA, Yoong G, Nguyen KB (1992) Apoptosis of alpha beta T lymphocytes in the nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis: its possible implications for recovery and acquired tolerance. *J Autoimmun* 5:401-410.
- Pender MP, Nguyen KB, McCombe PA, Kerr JF (1991) Apoptosis in the nervous system in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neurol Sci* 104:81-87.
- Pender MP, Rist MJ (2001) Apoptosis of inflammatory cells in immune control of the nervous system: role of glia. *Glia* 36:137-144.
- Peranzoni E, Zilio S, Marigo I, Dolcetti L, Zanovello P, Mandruzzato S, Bronte V (2010) Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Curr Opin Immunol* 22:238-244.
- Pettinelli CB, Fritz RB, Chou CH, McFarlin DE (1982) Encephalitogenic activity of guinea pig myelin basic protein in the SJL mouse. *J Immunol* 129:1209-1211.
- Purton LE, Dworkin S, Olsen GH, Walkley CR, Fabb SA, Collins SJ, Chambon P (2006) RARgamma is critical for maintaining a balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *J Exp Med* 203:1283-1293.
- Radi R (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4003-4008.
- Reth M (2002) Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat Immunol* 3:1129-1134.
- Riedemann NC, Guo RF, Ward PA (2003) The enigma of sepsis. *J Clin Invest* 112:460-467.
- Rodríguez PC, Ochoa AC (2008) Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol Rev* 222:180-191.
- Sander LE, Sackett SD, Dierssen U, Beraza N, Linke RP, Muller M, Blander JM, Tacke F, Trautwein C (2010) Hepatic acute-phase proteins control innate immune responses during infection by promoting myeloid-derived suppressor cell function. *J Exp Med* 207:1453-1464.
- Sanz MA (2006) Treatment of acute promyelocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 147-155.

Sastre A, Gago E, Baños M, Gómez E (2007) [Acute renal failure in the transretinoic syndrome]. *Nefrología* 27:184-190.

Schmid MC, Varner JA (2012) Myeloid cells in tumor inflammation. *Vasc Cell* 4:14.

Schmied M, Breitschopf H, Gold R, Zischler H, Rothe G, Wekerle H, Lassmann H (1993) Apoptosis of T lymphocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. Evidence for programmed cell death as a mechanism to control inflammation in the brain. *Am J Pathol* 143:446-452.

Schmielau J, Finn OJ (2001) Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res* 61:4756-4760.

Schopfer FJ, Baker PR, Freeman BA (2003) NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem Sci* 28:646-654.

Segal BM, Cross AH (2000) Fas(t) track to apoptosis in MS: TNF receptors may suppress or potentiate CNS demyelination. *Neurology* 55:906-907.

Semra YK, Seidi OA, Sharief MK (2002) Disease activity in multiple sclerosis correlates with T lymphocyte expression of the inhibitor of apoptosis proteins. *J Neuroimmunol* 122:159-166.

Serafini P, Mgebhoff S, Noonan K, Borrello I (2008) Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer Res* 68:5439-5449.

Seung LP, Rowley DA, Dubey P, Schreiber H (1995) Synergy between T-cell immunity and inhibition of paracrine stimulation causes tumor rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6254-6258.

Sharief MK, Noori MA, Zoukos Y (2002) Reduced expression of the inhibitor of apoptosis proteins in T cells from patients with multiple sclerosis following interferon-beta therapy. *J Neuroimmunol* 129:224-231.

Sinha P, Clements VK, Bunt SK, Albelda SM, Ostrand-Rosenberg S (2007) Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J Immunol* 179:977-983.

Skulina C, Schmidt S, Dornmair K, Babbe H, Roers A, Rajewsky K, Wekerle H, Hohlfeld R, Goebels N (2004) Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8⁺ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2428-2433.

Slaney CY, Toker A, La FA, Backstrom BT, Harper JL (2011) Naive blood monocytes suppress T-cell function. A possible mechanism for protection from autoimmunity. *Immunol Cell Biol* 89:7-13.

Sospedra M, Martin R (2005) Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23:683-747.

Steinman L (2007) A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 13:139-145.

Storch MK, Stefferl A, Brehm U, Weissert R, Wallstrom E, Kerschensteiner M, Olsson T, Linington C, Lassmann H (1998) Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol* 8:681-694.

Stuart LM, Lucas M, Simpson C, Lamb J, Savill J, Lacy-Hulbert A (2002) Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation. *J Immunol* 168:1627-1635.

Suzuki M, Konya C, Goronzy JJ (2008) Inhibitory CD8+ T cells in autoimmune disease. *Hum Immunol* 69:781-789.

Szczepanik M (2011) Mechanisms of immunological tolerance to the antigens of the central nervous system. Skin-induced tolerance as a new therapeutic concept. *J Physiol Pharmacol* 62:159-165.

Takahashi K, Aranami T, Endoh M, Miyake S, Yamamura T (2004) The regulatory role of natural killer cells in multiple sclerosis. *Brain* 127:1917-1927.

Takahashi K, Miyake S, Kondo T, Terao K, Hatakenaka M, Hashimoto S, Yamamura T (2001) Natural killer type 2 bias in remission of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 107:R23-R29.

Takeda N, Manabe I, Shindo T, Iwata H, Iimuro S, Kagechika H, Shudo K, Nagai R (2006) Synthetic retinoid Am80 reduces scavenger receptor expression and atherosclerosis in mice by inhibiting IL-6. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1177-1183.

Tallman MS, Altman JK (2009) How I treat acute promyelocytic leukemia. *Blood* 114:5126-5135.

Talmadge JE (2007) Pathways mediating the expansion and immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells and their relevance to cancer therapy. *Clin Cancer Res* 13:5243-5248.

Targoni OS, Baus J, Hofstetter HH, Hesse MD, Karulin AY, Boehm BO, Forsthuber TG, Lehmann PV (2001) Frequencies of neuroantigen-specific T cells in the central nervous system versus the immune periphery during the course of experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 166:4757-4764.

Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462.

Tobita T, Takeshita A, Kitamura K, Ohnishi K, Yanagi M, Hiraoka A, Karasuno T, Takeuchi M, Miyawaki S, Ueda R, Naoe T, Ohno R (1997) Treatment with a new synthetic retinoid, Am80, of acute promyelocytic leukemia relapsed from complete remission induced by all-trans retinoic acid. *Blood* 90:967-973.

Toker A, Slaney CY, Backstrom BT, Harper JL (2011) Glatiramer acetate treatment directly targets CD11b(+)Ly6G(-) monocytes and enhances the suppression of autoreactive T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scand J Immunol* 74:235-243.

Trapp BD, Nave KA (2008) Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci* 31:247-269.

Tsunoda I, Fujinami RS (2010) Neuropathogenesis of Theiler's murine encephalomyelitis virus infection, an animal model for multiple sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol* 5:355-369.

Tuohy VK, Sobel RA, Lees MB (1988) Myelin proteolipid protein-induced experimental allergic encephalomyelitis. Variations of disease expression in different strains of mice. *J Immunol* 140:1868-1873.

Turnquist HR, Zhao Z, Rosborough BR, Liu Q, Castellaneta A, Isse K, Wang Z, Lang M, Stolz DB, Zheng XX, Demetris AJ, Liew FY, Wood KJ, Thomson AW (2011) IL-33 expands suppressive CD11b⁺ Gr-1(int) and regulatory T cells, including ST2L⁺ Foxp3⁺ cells, and mediates regulatory T cell-dependent promotion of cardiac allograft survival. *J Immunol* 187:4598-4610.

Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, Fugger L (2008) Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 172:146-155.

Ugel S, Delpozzi F, Desantis G, Papalini F, Simonato F, Sonda N, Zilio S, Bronte V (2009) Therapeutic targeting of myeloid-derived suppressor cells. *Curr Opin Pharmacol* 9:470-481.

Van ZM, Huizinga R, Heijmans N, van MM, Wierenga-Wolf AF, Melief MJ, Hintzen RQ, 't Hart BA, Amor S, Boven LA, Laman JD (2009a) Surgical excision of CNS-draining lymph nodes reduces relapse severity in chronic-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Pathol* 217:543-551.

van ZM, Huizinga R, Melief MJ, Wierenga-Wolf AF, van MM, Voerman JS, Biber KP, Boddeke HW, Hopken UE, Meisel C, Meisel A, Bechmann I, Hintzen RQ, 't Hart BA, Amor S, Laman JD, Boven LA (2009b) Brain antigens in functionally distinct antigen-presenting cell populations in cervical lymph nodes in MS and EAE. *J Mol Med (Berl)* 87:273-286.

Varin A, Gordon S (2009) Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology. *Immunobiology* 214:630-641.

Venken K, Hellings N, Hensen K, Rummens JL, Medaer R, D'hooghe MB, Dubois B, Raus J, Stinissen P (2006) Secondary progressive in contrast to relapsing-remitting multiple sclerosis patients show a normal CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell function and FOXP3 expression. *J Neurosci Res* 83:1432-1446.

Venken K, Hellings N, Thewissen M, Somers V, Hensen K, Rummens JL, Medaer R, Hupperts R, 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* 123:79-89.

Vignali DA, Collison LW, Workman CJ (2008) How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8:523-532.

Walker LS, Abbas AK (2002) The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol* 2:11-19.

Walkley CR, Yuan YD, Chandraratna RA, McArthur GA (2002) Retinoic acid receptor antagonism in vivo expands the numbers of precursor cells during granulopoiesis. *Leukemia* 16:1763-1772.

Waxman FJ, Fritz RB, Hinrichs DJ (1980) The presence of specific antigen-reactive cells during the induction, recovery, and resistance phases of experimental allergic encephalomyelitis. *Cell Immunol* 49:34-42.

Wekerle H, Schwab M, Lington C, Meyermann R (1986) Antigen presentation in the peripheral nervous system: Schwann cells present endogenous myelin autoantigens to lymphocytes. *Eur J Immunol* 16:1551-1557.

Werner P, Pitt D, Raine CS (2001) Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Ann Neurol* 50:169-180.

Wu F, Cao W, Yang Y, Liu A (2010) Extensive infiltration of neutrophils in the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Histochem Cell Biol* 133:313-322.

Xu L, Hilliard B, Carmody RJ (2003) Arginase and autoimmune inflammation in the central nervous system. *Immunology* 110:141-148.

Yang R, Cai Z, Zhang Y, Yutzy WH, Roby KF, Roden RB (2006a) CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1⁺CD11b⁺ myeloid cells. *Cancer Res* 66:6807-6815.

Yang ZZ, Novak AJ, Stenson MJ, Witzig TE, Ansell SM (2006b) Intratumoral CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4⁺ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 107:3639-3646.

Yin B, Ma G, Yen CY, Zhou Z, Wang GX, Divino CM, Casares S, Chen SH, Yang WC, Pan PY (2010) Myeloid-derived suppressor cells prevent type 1 diabetes in murine models. *J Immunol* 185:5828-5834.

Youn JI, Gabrilovich DI (2010) The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *Eur J Immunol* 40:2969-2975.

Youn JI, Nagaraj S, Collazo M (2008) Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* 181:5791-5802.

Young MR, Newby M, Wepsic HT (1987) Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer Res* 47:100-105.

Zea AH, Rodríguez PC, Atkins MB, Hernandez C, Signoretti S, Zabaleta J, McDermott D, Quiceno D, Youmans A, O'Neill A, Mier J, Ochoa AC (2005) Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res* 65:3044-3048.

Zehntner SP, Brickman C, Bourbonniere L (2005) Neutrophils that infiltrate the central nervous system regulate T cell responses. *J Immunol* 174:5124-5131.

Zhang M, Caragine T, Wang H, Cohen PS, Botchkina G, Soda K, Bianchi M, Ulrich P, Cerami A, Sherry B, Tracey KJ (1997) Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: a counterregulatory mechanism that restrains the immune response. *J Exp Med* 185:1759-1768.

Zhou DC, Hallam SJ, Lee SJ, Klein RS, Wiernik PH, Tallman MS, Gallagher RE (1998) Constitutive expression of cellular retinoic acid binding protein II and lack of correlation with sensitivity to all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. *Cancer Res* 58:5770-5776.

Zhu B, Bando Y, Xiao S (2007) CD11b⁺Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 179:5228-5237.

Zhu B, Kennedy JK, Wang Y, Sandoval-Garcia C, Cao L, Xiao S, Wu C, Elyaman W, Khoury SJ (2011) Plasticity of Ly-6C(hi) myeloid cells in T cell regulation. *J Immunol* 187:2418-2432.

Ziaber J, Pasnik J, Baj Z (1998) The immunoregulatory abilities of polymorphonuclear neutrophils in the course of multiple sclerosis. *Mediators Inflamm* 7:335-338.

Zozulya AL, Clarkson BD, Ortler S, Fabry Z, Wiendl H (2010) The role of dendritic cells in CNS autoimmunity. *J Mol Med (Berl)* 88:535-544.

Zuvich RL, McCauley JL, Pericak-Vance MA, Haines JL (2009) Genetics and pathogenesis of multiple sclerosis. *Semin Immunol* 21:328-333.